

**Generierung und Charakterisierung von
rekombinanten Antikörperfragmenten
gegen das
Venezuelanische und Westliche
Pferdeenzephalitis-Virus**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
Dissertation

von
Torsten Rülker
aus
Rheda-Wiedenbrück

1. Referent: Professor Dr. Stefan Dübel

2. Referent: Professor Dr. Jürgen Bode

eingereicht am: 02.04.2012

mündliche Prüfung (Disputation) am: 14.09.2012

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Rülker, T., Voß, L., Thullier, P., O' Brien, L.M., Pelat, T., Perkins, S.D., Langermann, C., Schirrmann, T., Dübel, S., Marschall, H.J., Hust, M. and Hülseweh, B. *Isolation and characterisation of a human-like antibody fragment (scFv) that inactivates VEEV in vitro and in vivo*. PLoS One. 2012;**7**(5):e37242.
Epub 2012 May 30

Zusammenfassung

Das Venezolanische und das Westliche Pferdeenzephalitis-Virus (VEEV und WEEV) gehören zur Gattung der Alphaviren. Einige Subtypen dieser Viren sind humanpathogen und zählen als enzephalizide Viren zu den bioterroristischen Agenzien der Kategorie B. Bisher existieren nur wenige monoklonale Antikörper, die nur im Bereich der Diagnostik Verwendung finden. Die Behandlung bei Infektionen erfolgt nur unterstützend, eine antivirale Therapie steht bisher nicht zur Verfügung.

Ziel dieser Arbeit war die Generierung von Antikörpergenbibliotheken aus dem Knochenmark immunisierter Makaken (*Macaca fascicularis*) und die Isolierung virusspezifischer Antikörper mittels Phagen-Display-Technologie. Es konnten spezifisch bindende scFv-Fragmente aus den Immunbibliotheken isoliert werden, welche im Folgenden in das scFv-Fc Antikörperformat überführt und charakterisiert wurden. Die isolierten VEEV- und WEEV-spezifischen Antikörper konnten erfolgreich als Fänger- und Detektionsantikörper in ELISA-Experimenten eingesetzt werden, ein immunhistochemischer Nachweis infizierter Zellen konnte ebenfalls durchgeführt werden.

Der einzige gegen das VEE-Virus isolierte Antikörper, ToR67-3B4, wurde im Folgenden auf neutralisierende Eigenschaften untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass eine Verhinderung der Infektion *in vitro* für einige Virustypen möglich war. Zusätzlich dazu konnten *in vivo* Mäuse vor der Infektion mit den VEE-Subtypen TrD, Mena II, Fe37c und BeAn8 geschützt werden, wenn eine Behandlung mit dem scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 6 Stunden nach Infektion durchgeführt wurde. Damit wurde eine Protektion durch den Antikörper nachgewiesen, welcher die Mäuse somit effektiv vor einer Infektion schützt.

In dieser Arbeit wurden erstmals virusspezifische Antikörper aus einer Immunantikörpergenbibliothek nach Selektion auf aktiven Viruspartikeln isoliert. Diese Antikörper könnten zur schnellen Identifikation und Detektion von VEEV und WEEV eingesetzt werden. Für den VEEV-spezifischen Antikörper ToR67-3B4 besteht außerdem die Möglichkeit zum Einsatz in der Therapie, da eine Protektion vor Infektionen *in vivo* nachgewiesen werden konnte.

Abstract

Venezuelan and Western Equine Encephalitis virus (VEEV and WEEV) belong to the alphavirus genus. Some subtypes of these viruses are pathogenic to humans and are classified as potential agents of biological warfare and terrorism. Today, there are only few monoclonal antibodies available, which are mainly used in diagnostics. Treatment of infection is only symptomatic and supportive, an antiviral therapy is not available.

Aim of this study was the generation of immune antibody gene libraries from the bone marrow of immunised macaques (*Macaca fascicularis*) and the isolation of virus binding antibodies via phage display technology. By using this technique, specifically binding scFv-fragments were isolated from the immune libraries. The scFv fragments were transformed to scFv-Fc antibody format and their binding properties were characterised. The VEEV and WEEV specific antibodies were successfully used as capture and detector antibodies in ELISAs and were used to identify infected cells in immunohistochemistry studies.

The neutralising properties from scFv-Fc antibody ToR67-3B4, the only antibody isolated from the immune library derived from the VEEV immunised macaque, were examined *in vitro* and *in vivo*. The antibody was able to prevent infection of cells with several virus subtypes. Additionally it was able to prevent mice from being infected by the VEEV subtypes TrD, Mena II, Fe37c and BeAn8, when administered 6 hours after infection. This indicates that scFv-Fc ToR67-3B4 is able to protect mice effectively from infection.

This study describes an isolation of virus specific antibodies from an immune antibody gene library via selection on complete and active virus particles which was never shown before. The antibodies show great potential to be used for fast identification and detection of VEEV and WEEV. Especially the VEEV specific antibody ToR67-3B4 could probably be used in therapy because of its ability to protect mice in *in vivo* challenge studies.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Antikörper und Antikörperfragmente	1
1.2	Antikörper-Phagen-Display-Technologie	5
1.2.1	Bakteriophagen	6
1.2.2	Antikörper-Phagen-Display	7
1.2.3	Antikörpergenbibliotheken	8
1.2.4	Selektion von spezifischen Antikörperphagen	10
1.3	Alphaviren	12
1.3.1	Das Venezuelanische Pferdeenzephalitis-Virus (VEEV)	14
1.3.2	Das Westliche Pferdeenzephalitis-Virus (WEEV)	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Laborgeräte und Zubehör	17
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3	Chemikalien, Lösungen und Puffer	19
2.1.4	Medien und Supplemente	22
2.1.5	Bakterien, Säugerzelllinien und Bakteriophagen	24

2.1.6	Plasmide und Phagemide	24
2.1.7	Oligonukleotide	25
2.1.8	Enzyme und entsprechende Puffer	26
2.1.9	Kommerzielle Antikörper	26
2.1.10	Kit-Systeme	27
2.1.11	Software und Datenbanken	27
2.1.12	DNA- und Proteinstandards	28
2.2	Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA	28
2.2.2	Amplifikation von DNA	29
2.2.3	Reinigung von DNA	30
2.2.4	Präzipitation von DNA	31
2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.6	DNA-Konzentrationsbestimmung	31
2.2.7	Enzymatische Restriktion von DNA	32
2.2.8	DNA-Dephosphorylierung	32
2.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten	33
2.2.10	DNA-Sequenzierung	34
2.3	Mikrobiologische Methoden	34
2.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen	34
2.3.2	Lagerung von Bakterienkulturen	34
2.3.3	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	34
2.3.4	Herstellung der Immunantikörpergenbibliotheken	35
2.3.5	Produktion von Antikörperphagen	37
2.3.6	Titerbestimmung von Antikörperphagen	38

2.3.7	Selektion mit Antikörperphagenbibliotheken	38
2.3.8	Produktion von scFv-Fragmenten in MTPs	40
2.4	Biochemische Methoden	40
2.4.1	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	40
2.4.2	SDS-PAGE	43
2.4.3	Coomassie-Färbung von Proteingelen	44
2.4.4	Western-Blot	44
2.4.5	Immunfärbung	45
2.4.6	Affinitätschromatographie von scFv-Fc-Antikörpern	45
2.4.7	Reinigung von Alphaviren	46
2.4.8	Inaktivierung von Alphaviren	47
2.4.9	Biotinylierung von Antikörpern	47
2.5	Zellbiologische Methoden	47
2.5.1	Transfektion HEK293T-Zellen	47
2.5.2	Produktion von scFv-Fc-Fusionsproteinen	48
2.5.3	Produktion von VEE- und WEE-Viruspartikeln	49
2.5.4	Stabile Zelllinien	49
2.5.5	Neutralisationstests	51
2.5.6	Immunhistochemische Färbung von Vero-Zellen	52
2.6	Tierversuche	53
2.6.1	Passive Immunisierung von Mäusen	53
2.6.2	Immunisierung von Makaken	53
3	Ergebnisse	55
3.1	Generierung von drei scFv-Antikörpergenbibliotheken	55

3.2	Antikörperselektion auf aktiven Viruspartikeln	58
3.3	Screening monoklonaler Antikörper	59
3.4	Bioinformatische Analysen	60
3.5	Produktion von scFv-Fc-Antikörpern	61
3.6	Charakterisierung von scFv-Fc ToR67-3B4 mittels ELISA	64
3.7	Identifizierung des Antigens von scFv-Fc ToR67-3B4	69
3.8	Immunhistochemischer Nachweis VEEV- infizierter Zellen	71
3.9	Charakterisierung der WEEV-spezifischen scFv-Fc-Antikörper .	72
3.10	Immunhistochemischer Nachweis WEEV-infizierter Zellen	74
3.11	<i>In-Vitro</i> -Neutralisation von VEE-Viren	75
3.12	Halbwertszeit von scFv-Fc ToR67-3B4	78
3.13	<i>In-Vivo</i> -Neutralisation von scFv-Fc ToR67-3B4	79
4	Diskussion	85
	Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	99
	Literaturverzeichnis	111
	Lebenslauf und Danksagung	128
A	Anhang	129
A.1	ELISA mit Makaken-Seren auf Vero- Zellkulturüberstand	130
A.2	Monoklonale ELISAs nach den <i>Pannings</i>	131
A.3	Einzelexperimente zum VEEV-Sandwich-ELISA	134

1

Einleitung

1.1 Antikörper und Antikörperfragmente

Antikörper, die auch als Immunglobuline bezeichnet werden, sind ein wesentlicher Bestandteil der adaptiven Immunantwort bei Wirbeltieren (Vertebraten ab der Überklasse der Gnathostomata). Diese Moleküle binden spezifisch an körperfremde Substanzen wie z. B. Toxine oder Krankheitserreger und bilden durch ihre funktionellen Eigenschaften eine Schnittstelle zwischen dem adaptiven und dem zellulären Immunsystem. Neben der Bindung an Antigene dienen sie auch zu deren Markierung, wodurch weitere Reaktionskaskaden, wie Neutralisierung, Opsonisierung oder die Aktivierung des Komplementsystems, ausgelöst werden können. Diese beiden Funktionen sind im Antikörpermolekül strukturell voneinander getrennt, wobei die Antigenbindung durch die variablen V-Regionen am aminoterminalen Ende erfolgt und die weitere Aktivierung des Immunsystems durch die konstanten Regionen erfolgt, die am Carboxylende lokalisiert sind [1].

Nach dem Kontakt mit einem Antigen werden im Menschen fünf verschiedene Klassen (Isotypen) von Immunglobulinen (IgM, IgE, IgA, IgD, und IgE) durch B-Lymphozyten gebildet, die anhand ihrer konstanten Regionen voneinander unterschieden werden, welche jeweils unterschiedliche Effektorfunktionen aufweisen. Zunächst exprimieren alle B-Lymphozyten die transmembrane Vari-

ante des IgM, auf reifen B-Lymphozyten findet zusätzlich eine Koexpression einer transmembranen Form von IgD statt. Nach dem Kontakt mit einem Antigen, dem so genannten Antigen-Stimulus, wird die Differenzierung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen eingeleitet, welche die pentamere Form des IgM sekretieren. Außerdem findet bei einem Teil der B-Lymphozyten ein Isotypenwechsel (*class switch*) statt, so dass andere Isotypen (IgG, IgE oder IgA) durch diese Zellen sekretiert werden. Mit etwa 80 % aller im humanen Serum enthaltenen Antikörper bildet IgG den Hauptbestandteil der Immunglobuline [1].

Immunglobuline besitzen als Heterotetramere eine molekulare Masse von ungefähr 150 kDa, je nach Multimerisierungsgrad sogar bis zu 940 kDa [2]. Sie bestehen aus zwei identischen leichten Ketten (je 25 kDa, etwa 220 AS) und zwei identischen schweren Ketten (je 50 kDa, etwa 440 AS), die über kovalente Disulfidbrücken und nicht-kovalente Bindungen miteinander verknüpft sind. Die schwere Kette eines Immunglobulins besteht aus 4 Immunglobulindomänen mit etwa 110 AS, während die leichte Kette nur zwei Domänen gleicher Größe besitzt. Bei den leichten Ketten wird zwischen κ - und λ -Ketten unterschieden, bei den schweren Ketten erfolgt eine Unterscheidung zwischen den fünf Subklassen α , γ , ε , δ und μ , die gleichzeitig den Isotypen bestimmen (IgM (μ), IgD (δ), IgG (γ), IgA (α) und IgE (ε)) [1].

Die Domänen der leichten Kette werden aufgrund ihrer Funktion als variable Domäne (V_L) und konstante Domäne (C_L) bezeichnet, bei der schweren Kette wird in eine variable Domäne (V_H) und drei konstante Domänen (C_{H1} , C_{H2} und C_{H3}) unterteilt. Antikörper der Isotypen IgM und IgE bilden dabei eine Ausnahme, da sie eine vierte konstante Domäne (C_{H4}) besitzen.

Jedes Immunglobulin-Molekül besitzt zwei identische Fv-Regionen, die sich jeweils aus einer variablen Domäne der leichten (V_L) und schweren (V_H) Kette zusammensetzen. Innerhalb dieser Domänen sind drei hypervariable Regionen lokalisiert, die als CDRs (*complementarity determining regions*) bezeichnet werden. Diese Regionen vermitteln den Großteil der spezifischen Bindung gegenüber dem Antigen. Dabei wird die direkte Kontaktstelle des Antikörpers zum Antigen als Paratop, die des Antigens als Epitop bezeichnet. Zwischen den CDRs liegen die Gerüstregionen (*framework regions*, FRs), die durch β -

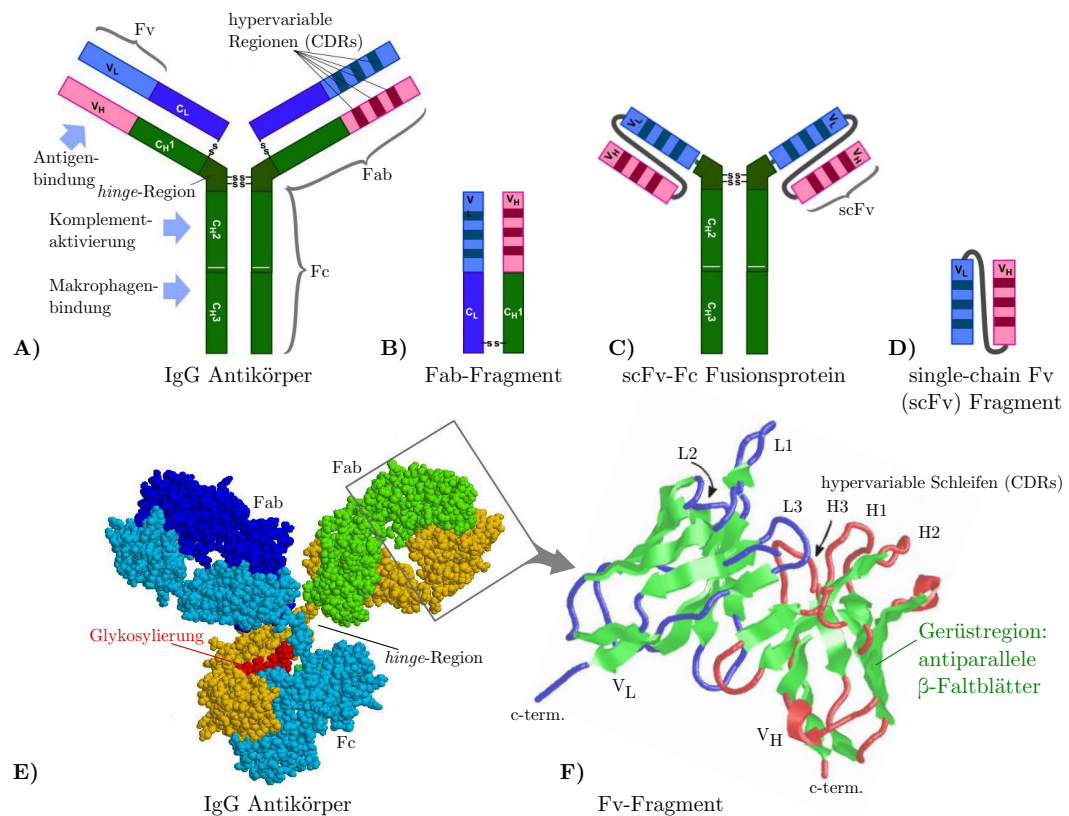


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung von IgG-Antikörpern und rekombinanten Antikörperfragmenten – A) Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers; B) Schematische Darstellung eines Fab-Fragments; C) Schematische Darstellung eines scFv-Fc-Antikörpers; D) Schematische Darstellung eines scFv-Fragments; E) Kalottenmodell eines IgG-Antikörpers; F) Schematische Darstellung der Fv-Region eines IgG-Antikörpers. Die einzelnen CDRs sind gesondert gekennzeichnet. (Abbildungen modifiziert nach Dübel)

Faltblattstrukturen der Stabilisierung der Bindestelle dienen. Im Gegensatz zu den variablen Domänen, die für die Antigenbindung zuständig sind, vermitteln die konstanten Domänen der schweren Ketten die Effektorfunktionen der Antikörper (Abbildung 1.1) [1, 3].

Mittels gentechnischer Methoden können unterschiedliche Antikörperformate rekombinant hergestellt oder durch proteolytische Spaltung von Antikörpern erstellt werden. Beispielsweise können mit Hilfe der Thiolprotease Papain Antikörper in ein Fc-Fragment (Fc: *Fragment crystallizable*) und zwei identische Fab-Fragmente (Fab: *Fragment antigen binding*) gespalten werden. Die Fab-

Fragmente bestehen je aus einer vollständigen leichten Kette und dem V_H - und C_H1 -Bereich der schweren Kette, die über eine Disulfidbrücke am Carboxylende vom C_L - und C_H1 -Bereich miteinander verbunden sind. Die Stabilität und die Antigenbindeeigenschaften bleiben auch in diesem Format erhalten und sind denen eines IgG-Antikörpers ähnlich [4, 5]. Durch die Protease Pepsin wird ein IgG-Antikörper in der *hinge*-Region gespalten und es entsteht ein bivalentes $F(ab)_2$ -Fragment. Aufgrund von einfachen und vorteilhafteren gentechnischen Methoden wird allerdings heutzutage die proteolytische Spaltung von Antikörpern kaum noch durchgeführt.

Zu Forschungszwecken und auch in der Diagnostik und Therapie werden heute hauptsächlich vollständige monoklonale Antikörper oder polyklonale Antikörpergemische eingesetzt. Allerdings wäre es für einige Anwendungen von Vorteil, kleine rekombinante Antikörperformate zu nutzen. Dabei würde je nach Anwendung nur die Antigenbindung benötigt werden, nicht aber die Vermittlung von Effektorfunktionen durch das Fc-Fragment. Diese Art von rekombinanten Antikörpern kann z. B. für die Neutralisation von Toxinen genutzt werden. Außerdem eignen sie sich besonders zur Anwendung in der Therapie, da sie aufgrund ihrer geringen Größe schneller renal ausgeschieden werden, sowie auch bedeutend besser solide Tumoren penetrieren können [6]. Ein weiterer und zugleich der wahrscheinlich größte Vorteil der rekombinanten Antikörperformate liegt darin, dass andere Proteine oder Immuntoxine durch gentechnische Methoden mit ihnen fusioniert werden können. So können Wirkstoffe gezielt an den Ort gelenkt werden, an dem sie ihre Funktion erfüllen sollen.

Ein im Vergleich mit einem IgG sehr kleines Format, in dem noch eine Bindung an das Antigen gewährleistet ist, ist das rekombinante scFv-Format (*single chain Fragment variable*). In diesem Format sind nur noch die variablen Bereiche der schweren und leichten Kette (V_H und V_L) vorhanden. Da alle weiteren Domänen fehlen und somit keine kovalente Verknüpfung der beiden Domänen über Disulfidbrücken möglich ist, sind diese über einen hydrophilen Peptidlinker miteinander verbunden (Abbildung 1.1 D)). Dieser Linker ermöglicht es, dass die V-Domänen sich aneinander anlagern können und somit einen funktionellen scFv bilden [7, 8]. Der Peptidlinker besteht meist aus 15–20 Ami-

nosäuren und verbindet das Carboxylende der V_H -Domäne mit dem aminoterminalen Bereich der V_L -Domäne. Eine veränderte Orientierung des Linkers ist ebenfalls möglich und kann zu einer verbesserten räumlichen Anordnung führen [9]. Die Nachteile eines scFvs sind die geringere Stabilität gegenüber Fab-Fragment und IgG und auch die Neigung zu Dimer- und Aggregatbildung bei hohen Proteinkonzentrationen [10]. Allerdings überwiegen hier die Vorteile einer geringen Größe (ca. 25–35 kDa) und auch die Möglichkeit einer Produktion in *Escherichia coli*-Zellen. Die Produktion dieser scFvs im prokaryotischen System benötigt allerdings eine Fusion des scFvs mit einem Signalpeptid, welches die Sekretion in das oxidierende Milieu des Periplasmas gram-negativer Bakterien ermöglicht. Dort kann die intramolekulare Anlagerung zu einem funktionellen scFv stattfinden [11]. Fab-Fragmente, deren Stabilität aufgrund einer kovalenten Bindung deutlich höher ist, können ebenfalls in prokaryotischen Systemen produziert werden. Zusätzlich dazu hat das Fab-Fragment den Vorteil, dass durch eine gentechnische Fusion mit einem Fc-Fragment ein vollständiger Antikörper erstellt werden kann. ScFvs können ebenfalls mit einem Fc-Fragment über die *hinge*-Region fusioniert werden, das so generierte Format wird als scFv-Fc-Fusionsprotein bezeichnet. Zur Produktion dieser IgG-ähnlichen Fusionsproteine wurden schon diverse Vektoren für eukaryotische Expressionssysteme beschrieben [12].

1.2 Antikörper-Phagen-Display-Technologie

Neben den klassischen Methoden wie Hybridomatechnologie [13] und Immunisierung stellt die Antikörper-Phagen-Display-Technologie eine weitere Möglichkeit dar, spezifische Antikörper zu identifizieren. Im Gegensatz zu den anderen genannten Methoden ist beim Phagen-Display allerdings keine Immunisierung von Vertebraten erforderlich, da Produktion und Selektion im prokaryotischen System erfolgt. Zur erfolgreichen Nutzung der Phagen-Display-Technologie müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein. Zum einen ist dies die Produktion von funktionellen Antikörperfragmenten in Prokaryoten, zum anderen eine effiziente Selektionsstrategie des gewünschten Antikörperfragments

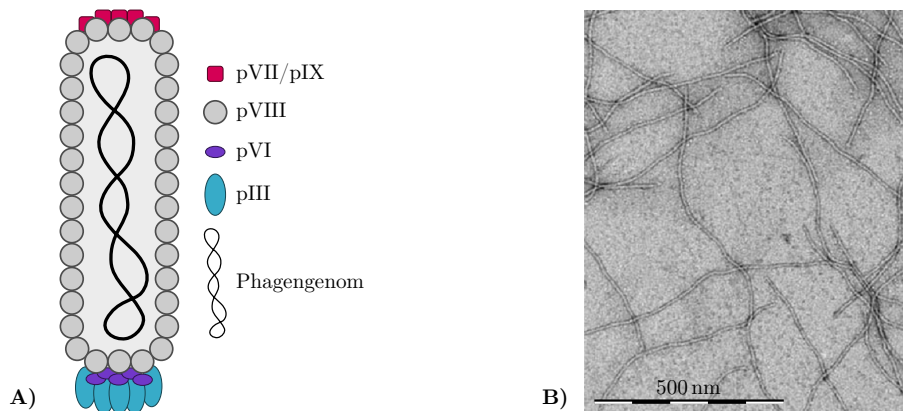


Abbildung 1.2: Der Bakteriophage M13 – **A)** Schematische Abbildung eines M13 Bakteriophagen mit den an der Hülle beteiligten Proteinen und dem innenliegenden Phagen-genom, **B)** Elektronenmikroskopische Aufnahme von M13-Bakteriophagen nach Negativkontrastierung, nach [16], modifiziert

inklusive seiner genetischen Information. [11, 14]. Für eine Selektion wird beim Phagen-Display das natürliche Funktionsprinzip von B-Lymphozyten nachgebildet, wobei Genotyp und Phänotyp auf einem Partikel physikalisch gekoppelt vorliegen. Um diese Kopplung und eine limitierte klonale Selektion zu erreichen, werden diese Methoden mithilfe von filamentösen Phagen durchgeführt, welche sich als äußerst effizient und robust erwiesen haben [15].

1.2.1 Bakteriophagen

Viren mit einem Wirtsspektrum, welches auf Bakterien begrenzt ist, werden Bakteriophagen (kurz: Phagen) genannt. Zur Gruppe der filamentösen Phagen gehören die lysogenen Phagen M13, fd und f1, welche nur Bakterienzellen infizieren, die ein F-Plasmid tragen (F^+ -Bakterien). Diese Phagen nutzen die auf der Bakterienzelle präsentierten F-Pili, um sich zur Infektion anzulagern. Das Virengenom, welches aus einzelsträngiger, zirkulärer DNA besteht, enthält elf Gene, von denen drei für die Replikation, fünf für die Produktion neuer Hüllproteine und drei für die Assemblierung neuer Phagenpartikel benötigt werden. Die Virushülle besteht zum Großteil aus etwa 2700 Kopien des pVIII Proteins, weitere Bestandteile sind nur jeweils fünf Proteine des pVII und pIX an einem und pVI und pIII an dem anderen anderen Ende des Phagenpartikels. Nach

einer Infektion von F^+ -Bakterien wird die Wirtszelle nicht getötet, sondern ihr Wachstum nur um etwa 50 % verringert. Jede infizierte Wirtszelle bildet 100–200 Phagenpartikel, die etwa 600–700 nm lang und etwa 7 nm breit sind. Diese Art der filamentösen Phagen sind resistent gegen Trypsinverdau und hohe Temperaturen (Abbildung 1.2) [15, 17, 18].

1.2.2 Antikörper-Phagen-Display

Das grundsätzliche Prinzip des Phagen-Displays ist die Nachahmung der natürlichen Funktionsweise von B-Lymphozyten. Dabei wird ein phagenfremdes Protein als Fusion mit einem Hüllprotein auf der Oberfläche des Phagen präsentiert, während die genetische Information dieses Moleküls im Phagengenom (Phagemid) enthalten ist. Diese genetische Information des Moleküls wird nach der Infektion ebenfalls vervielfältigt und das Genprodukt nach Replikation und Assemblierung der neuen Phagenpartikel wiederum auf dessen Oberfläche präsentiert. Bereits im Jahr 1985 wurde gezeigt, dass ein phagenfremdes Peptid mit dem Hüllprotein pIII fusioniert werden konnte, ohne dessen Funktion stark zu beeinträchtigen. Schon zu diesem Zeitpunkt war die genetische Information im Phagengenom enthalten [14]. Die gleiche Methode einer pIII-Fusion wurde 1990 erstmals mit scFv-Fragmenten durchgeführt, allerdings war die Produktion der scFv-Phagen mit dem genutzten Produktionssystem kaum möglich [19, 20]. Der Grund für die schlechte Produktion wurde im Selektionsnachteil für die Phagenpartikel gefunden, sobald ein für den Wirt toxisches scFv-pIII Fusionsprotein statt eines normalen pIII Proteins produziert werden sollte. Durch die Nutzung von speziell zur Präsentation von Proteinen entwickelten Phagemid-Vektoren, die auch als Phagen-Display Vektoren bezeichnet wurden, konnte dieser Nachteil stark reduziert werden [19, 21, 22]. Diese Vektoren bestehen aus einem Plasmid, welches die genetischen Information für die Verpackung in ein Phagenpartikel besitzt. Allerdings kann erst durch die Anwesenheit eines Helferphagen, welcher das gesamte Repertoire für die Replikation der Phagenpartikel beisteuert, die einzelsträngige Phagemid-DNA in neue Phagenpartikel verpackt und das scFv-pIII Fusionsprotein in die Phagenoberfläche integriert werden.

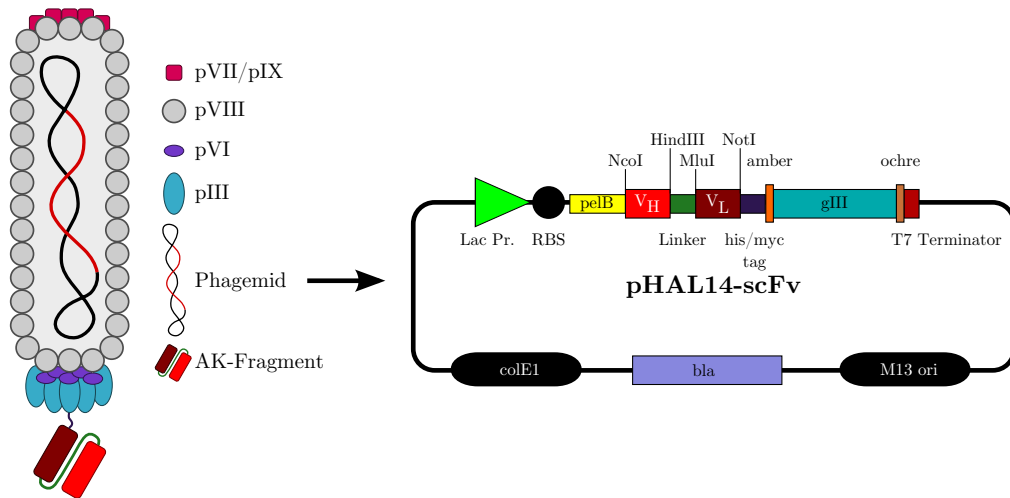


Abbildung 1.3: Antikörper-Phage und Phagemid-Vektor pHAL14 – Links: Schematische Abbildung eines scFv-präsentierenden M13 Phagens. Die genetische Information des scFvs ist im Phagemid in rot dargestellt. Rechts: Das Schema des pHAL14 Phagemids zeigt alle für ein Phagemid benötigten Elemente.

Zusätzlich zu den schon genannten Modifikationen erfolgt eine Expression des Fusionsproteins nicht konstitutiv, sondern unter Kontrolle des induzierbaren lac-Promotors (PlacZ). Dadurch ist es möglich, nur während der Anwesenheit von Helferphagen die Produktion des Fusionsproteins zu induzieren, so dass es in die Phagenhüllen integriert werden kann. Besonders beim Erstellen von Antikörpergenbibliotheken wäre eine konstitutive Expression des Fusionsproteins extrem hinderlich, da innerhalb weniger Replikationsrunden *non-sense* Mutationen dominieren würden.

1.2.3 Antikörpergenbibliotheken

Eine Antikörpergenbibliothek bezeichnet eine Sammlung von Phagen, welche die genetische Information unterschiedlichster Antikörper in einem Phagemid-Vektor enthalten und diese Antikörper auf ihrer Oberfläche präsentieren. Dabei werden sie nach dem verwendeten Genrepertoire und dem Spenderorganismus unterschieden und als Immunantikörperbibliotheken und universelle Antikörpergenbibliotheken bezeichnet. Zu den universellen Antikörpergenbibliotheken

gehören die naiven, semi-synthetischen und die synthetischen Antikörpergenbibliotheken [23]. Aus immunisierten Spenderorganismen, in denen eine primäre sowie sekundäre Immunantwort stattgefunden hat, können Immunbibliotheken generiert werden. Dazu werden die V-Gene IgG-sekretierender Plasmazellen mittels spezifischer Oligonukleotid-Sets per PCR (Polymerase-Kettenreaktion, *Polymerase Chain Reaction*) amplifiziert. Dabei enthält das Genrepertoire hauptsächlich Antikörpergensequenzen gegen das Antigen, welches zur Immunisierung des Spenderorganismus genutzt wurde. Mit dieser Technik ist es möglich, aus den Immunbibliotheken hochaffine Antikörper gegen das zur Immunisierung eingesetzte Antigen zu isolieren, bei denen die monovalenten Dissoziationskonstanten im subnanomolaren Bereich liegen können [24, 25]. Aufgrund bedeutend geringerer Diversität der Immunbibliotheken können allerdings kaum Antikörper gegen weitere Antigene isoliert werden.

Zur Herstellung naiver Bibliotheken wird das naive und komplette IgM-Genrepertoire aus B-Lymphozyten von nicht immunisierten Spendern isoliert und die V-Gene amplifiziert. IgM-Antikörper sind an der primären Immunantwort beteiligt, so dass besonders Antikörpersequenzen isoliert werden, die nicht die klonale Selektion durchlaufen haben. Somit ist bei naiven Bibliotheken die Diversität bedeutend größer und es können Antikörper gegen nahezu jedes Antigen isoliert werden. Im Vergleich zu Immunbibliotheken besitzen die daraus isolierten Antikörper gegenüber ihrem Antigen jedoch meist eine geringere Affinität, welche allerdings durch gentechnische Methoden nachträglich erhöht werden kann [26].

In semi-synthetischen Antikörpergenbibliotheken werden in bestimmten Bereichen der Antikörper artifizielle Gensequenzen eingefügt (z. B. randomisierte CDR3-Bereiche). Bei voll synthetischen Bibliotheken werden neben vollständig randomisierten CDR-Bereichen auch künstliche Framework-Bereiche eingesetzt, wodurch die Diversität dieser Bibliotheken extrem groß ist [27, 28].

Zur Herstellung der Antikörpergenbibliothek werden die amplifizierten IgG- oder IgM-Antikörpersequenzen in ein geeignetes Phagemid-System kloniert und in *E. coli*-Zellen transformiert. Mittels Infektion dieser Bakterien mit einem Helferphagen erfolgt die Verpackung der Phagemide in einen funktionellen

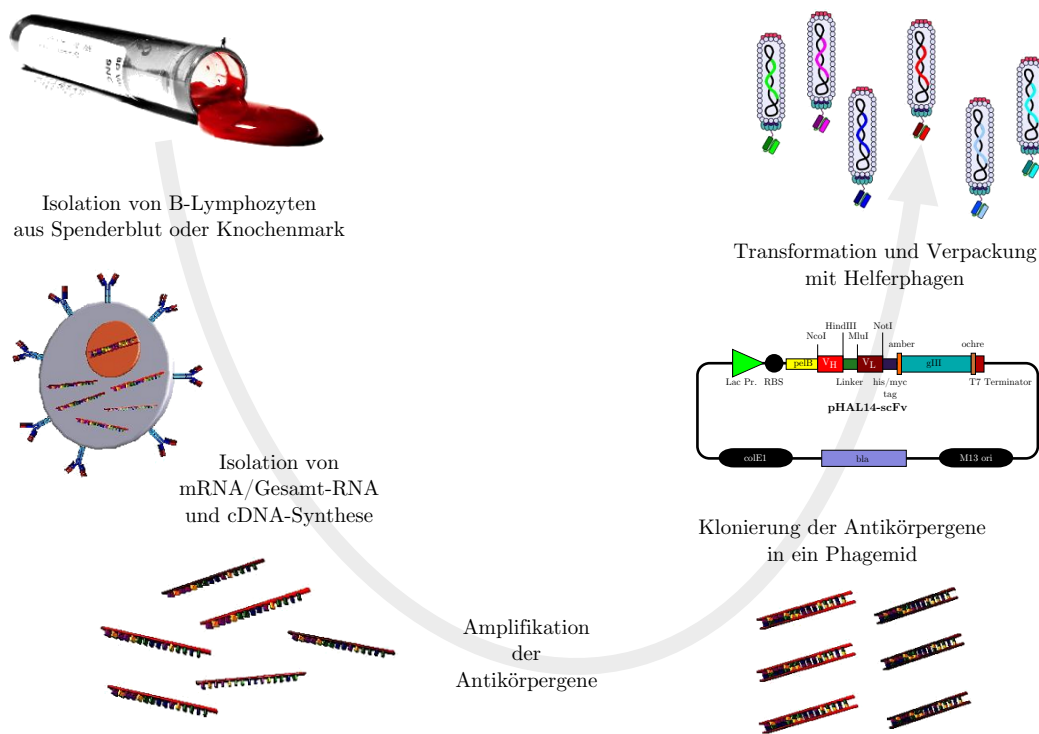


Abbildung 1.4: Generierung einer Antikörperbibliothek – Schematische Darstellung zur Herstellung einer Antikörpergenbibliothek

Antikörperphagen (Abbildung 1.4). Da insbesondere die Transformationseffizienz die Komplexität einer Antikörpergenbibliothek bestimmt, werden heute nur noch spezielle Phagemid-Systeme mit erhöhter Transformationseffizienz im Vergleich zum M13-Phagenom verwendet.

1.2.4 Selektion von spezifischen Antikörperphagen

Zur Selektion spezifischer Antikörper, welches in Anlehnung an die Goldwäsche auch als *panning* bezeichnet wurde, können unterschiedliche Verfahren angewandt werden. Diese Verfahren können sich in Inkubations- und Immobilisierungsmethoden deutlich unterscheiden und so an die jeweilige Selektionsstrategie angepasst werden [29].

Um die Selektion auf einem bestimmten Antigen durchführen zu können, wird das Antigen an einer festen Phase immobilisiert. Diese Immobilisierung kann

auf Kunststoffoberflächen von Mikrotiterplatten, in Immunröhrchen oder an magnetischen *beads* durchgeführt werden [21, 30, 31]. Dabei werden die Eigenschaften des Antigens mit einbezogen. Bei der Möglichkeit einer partiellen Denaturierung durch die Bindung an einer Kunststoffoberfläche können die Antigene zum Beispiel durch zuvor immobilisierte monoklonale Antikörper gebunden werden. Andere Möglichkeiten bestehen in der Bindung durch spezielle Linker-Systeme wie Biotin-Streptavidin-Kopplungen an magnetischen *beads*. Zur Verringerung von unspezifischen Bindungen werden zur Blockierung potentieller Bindestellen unterschiedliche Reagenzien, wie Milchpulver-Lösung, BSA oder spezielle kommerzielle Reagenzien, genutzt. Außerdem ist es möglich, jeden Parameter für die Selektion je nach Verwendungszweck der Antikörper speziell einzustellen, der einen Einfluss auf die Spezifität, Affinität oder Stabilität der Antikörper haben könnte. Nach der Immobilisierung des Antigens wird die in Phagen verpackte Antikörpergenbibliothek auf dem Antigen inkubiert. Nicht oder nur schwach bindende Antikörperphagen werden im Anschluss durch mehrere Waschstschritte, die ebenfalls je nach Wunsch mehr oder weniger stringent durchgeführt werden können, entfernt. Die gebundenen Antikörperphagen können dann durch eine pH-Verschiebung oder durch Trypsin eluiert werden. Dabei löst das Trypsin im Falle von pHAL14-Phagemiden den scFv von den Phagenpartikeln, so dass die Phagen zu einer Infektion von *E. coli*-Zellen genutzt werden können. Eine Amplifikation von neuen Antikörperphagen wird durch eine Co-Infektion mit Helferphagen erreicht, welche die benötigte genetische Information für die restlichen Phagenhüllproteine in die Zellen einbringen. Dabei kann zwischen dem M13K07 und dem Hyperphage als Helferphagen gewählt werden, wobei der M13K07 für eine monovalente Präsentation von Antikörpern auf den Phagen sorgt. Der Hyperphage trägt zusätzlich eine Deletion im pIII-Gen, wodurch die gebildeten pIII::scFv-Fusionsproteine nicht mit dem Wildtyp-pIII konkurrieren. Dadurch wird eine oligovalente Präsentation der Antikörperfragmente erreicht [32, 33].

Die amplifizierten Antikörperphagen werden in folgenden Selektionsrunden eingesetzt, wodurch eine Anreicherung von spezifisch bindenden Antikörperphagen erreicht wird (Abbildung 1.5). Nach 2–5 Selektionsrunden werden die

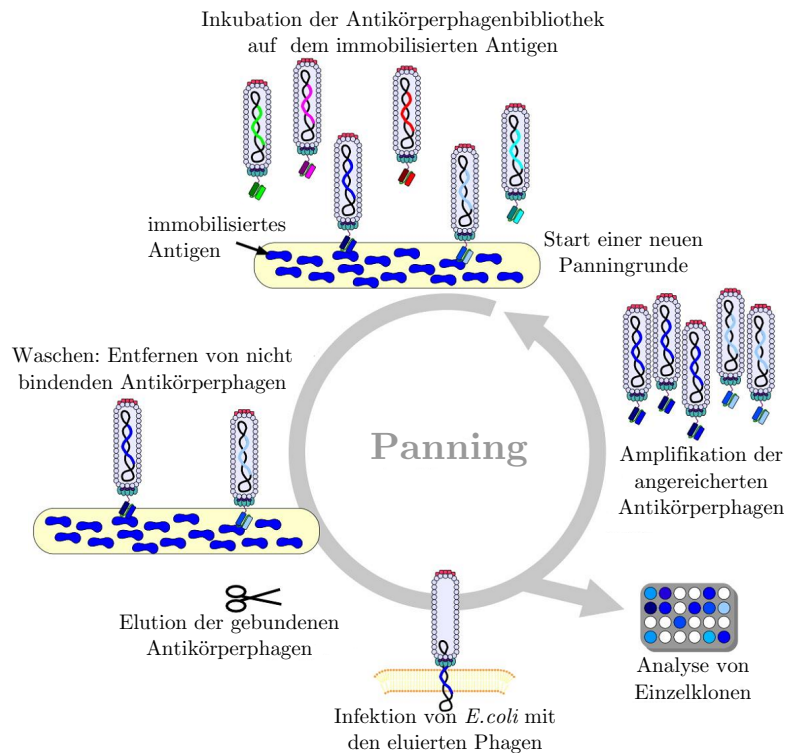


Abbildung 1.5: Antikörperselektion (*Panning*) – Die Abbildung zeigt schematisch den Ablauf einer Antikörperselektion (*Panning*runde). Nach 2-5 Runden kann das *Panning* beendet werden, die Analyse von Einzelklonen erfolgt mittels ELISA.

infizierten *E. coli*-Zellen nicht zu einer erneuten Phagenproduktion genutzt, sondern auf Agarplatten ausgestrichen. Die vereinzelt Kolonien enthalten so einen individuellen scFv-Klon und können zur Produktion von Antikörpern genutzt werden, die in einem *Screening* auf ihre Spezifität untersucht werden können.

1.3 Alphaviren

Alphaviren bilden die Gattung der Arboviren in der Familie der *Togaviridae*. Diese Gattung umfasst sieben serologische Gruppen mit insgesamt fast 30 unterschiedlichen Alphaviren, die bislang weltweit isoliert wurden [34]. Diese Viren infizieren unterschiedliche Vertebraten (z.B. Wildvögel, Nager) und werden meist über Stechmücken übertragen. Ihre Verbreitung ist aufgrund

von spezifischen ökologischen Bedingungen sowie den natürlichen Wirten und Überträgern streng geographisch begrenzt [35, 36].

Das Genom der Viren besteht aus einer (+)-RNA-Einzelstrang, welcher zwei offene Leseraster enthält. Ein Leseraster kodiert vier Nichtstrukturproteine, das andere Leseraster beinhaltet die Strukturproteine E3 und 6K, sowie die an der Struktur hauptsächlich beteiligten Proteine C, E1 und E2. Der mRNA-Strang wird ausschließlich von dem etwa 33 kDa großen Capsidprotein C umhüllt. Das Capsid ist von einer Lipidmembran umgeben, in der die Proteine E1 und E2 verankert sind [37].

Das Glycoprotein E1 ist etwa 56 kDa groß und wird mit der Hämagglutination von roten Blutkörperchen in Verbindung gebracht [38] und zählt als stark konserviertes Protein innerhalb der Alphaviren [36, 39]. Das Glycoprotein E2 ist etwa 50 kDa groß und wurde nach erfolgreichen Immunisierungen als Antigen identifiziert, welches zu neutralisierenden Antikörpern führte [40–43]. Beide Glycoproteine bilden Heterodimere, welche sich wiederum zu Trimeren zusammenlagern, die in der Lipidmembran verankert sind. Durch diese Anlagerung entsteht eine typische *spike*-Struktur, von der auf einem Viruspartikel etwa 80 vorkommen. Der Durchmesser eines Virions liegt bei etwa 60–80 nm [44].

Bisher wurde nur bei wenigen Vertretern das 10 kDa große Strukturprotein E3 nachgewiesen [37], das 6 kDa großen Strukturprotein 6K konnte jedoch bei den bisher bekannten Alphaviren nicht nachgewiesen werden.

Einige Vertreter der Alphaviren gelten als humanpathogen und werden als potentielle biologische Kampfstoffe klassifiziert [45]. Besonders die Viren der Venezuelanischen, Westlichen und Östlichen Pferdeenzephalitiden, welche in Nord- und Südamerika vorkommen, können beim Menschen Krankheiten hervorrufen. Dazu gehören milde fiebrige Erkrankungen, aber auch schwere Fälle bis hin zu einer tödlichen Enzephalitis.

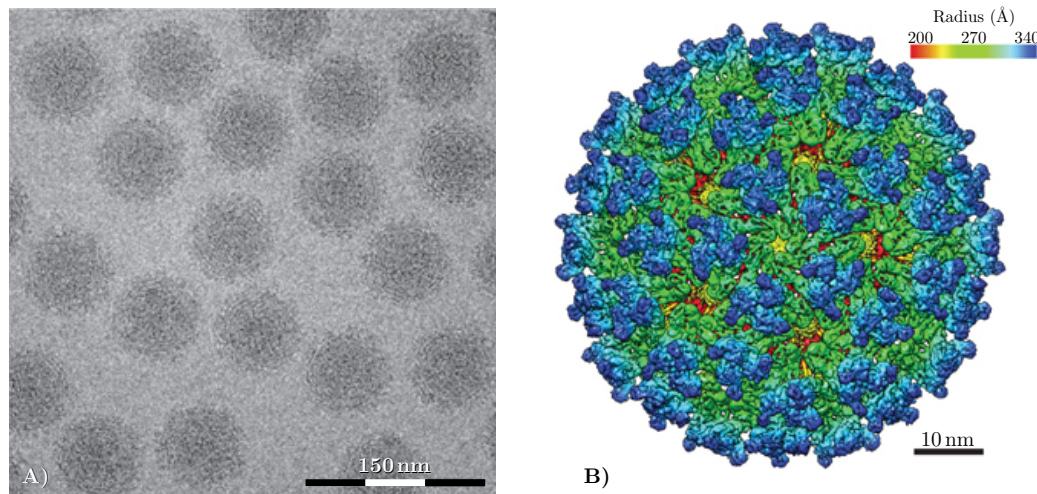


Abbildung 1.6: VEEV-Partikel, mikroskopische Aufnahme und Schema – A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von VEEV TC-83-Viruspartikeln. **B)** Radiale, gefärbte 3D-Rekonstruktion eines VEEV-Partikels. Gezeigt ist die Verteilung des E1-Glycoproteins (Grün) und des E2-Glycoprotein (Blau). Beide Abbildungen modifiziert aus [48].

1.3.1 Das Venezuelanische Pferdeenzephalitis-Virus (VEEV)

Das Venezuelanische Pferdeenzephalitis-Virus (VEEV, Abbildung 1.6) wurde erstmals 1934 aus dem Gehirn eines Pferdes in Venezuela isoliert [46], 1943 wurde erstmals eine Infektion eines Menschen dokumentiert [47]. Dabei wurde ein Labormitarbeiter infiziert, der an der Isolation von VEEV-verwandten Stämmen arbeitete.

VEEV hat bis heute diverse Epidemien unter Menschen ausgelöst, besonders gut dokumentiert wurden diese in den 90er Jahren in Peru und Mexiko [49–52]. Eine Infektion mit VEEV löst im Menschen leichtes Fieber bis hin zu einer tödlichen Enzephalitis aus, wobei die Sterblichkeit bei verschiedenen lokalen Ausbrüchen zwischen 4 und 35 % lag [53]. Basierend auf der Tatsache, dass das VEE-Virus auf den Menschen übertragbar ist und schwerwiegende Krankheitssymptome auslösen kann, ist es als bioterroristisches Agens der Kategorie B (zweithöchste Risikopriorität) klassifiziert. Zusätzlich dazu kann es mit relativ geringem Aufwand in großen Mengen produziert werden und ist als Aerosol hochinfektiös [54, 55].

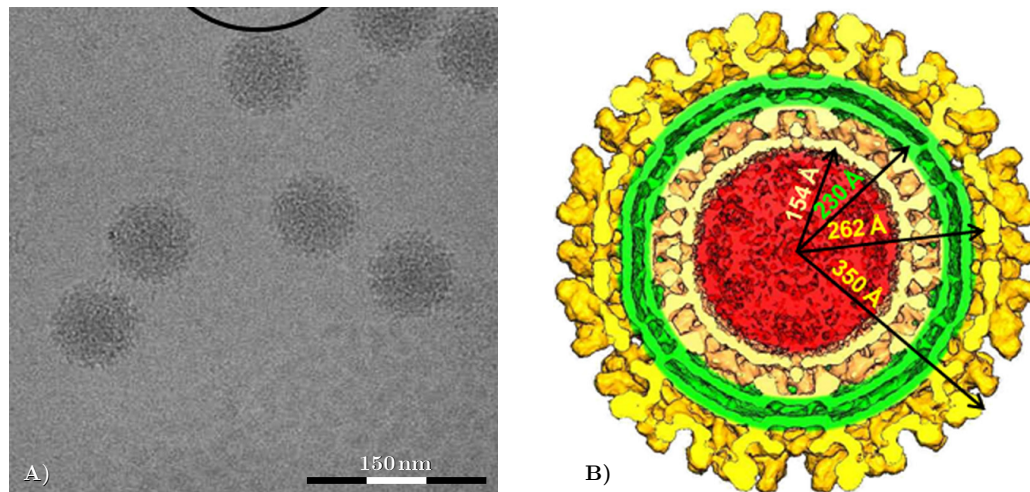


Abbildung 1.7: WEEV-Partikel, mikroskopische Aufnahme und Schema – **A)** Elektronenmikroskopische Aufnahme von WEEV-Viruspartikeln. **B)** 3D-Rekonstruktion eines WEEV-Partikels. In Grün dargestellt ist die Lipidmembran, in Gelb ist die äußere Struktur bestehend aus E1- und E2-Glycoprotein dargestellt. Beide Abbildungen modifiziert aus [59].

Die Viren des serologischen VEEV-Komplexes werden in sechs Subtypen unterteilt, wobei nur für Virusstämme des Subtyps 1 beschrieben wurde, dass sie im Menschen schwerwiegende Erkrankungen auslösen können [36]. Daher wurde aus einem dieser Stämme, dem *Trinidad Donkey*-Stamm (TrD), ein attenuierter Impfstamm durch das Passagieren in einer Meerschweinchenzelllinie hergestellt [56]. Dieser so genannte Stamm VEEV-TC83, wurde allerdings nie zur Immunisierung gefährdeter Bevölkerungen genutzt, da eine Impfung zum Teil schwere Nebenwirkungen auslösen konnte [56, 57]. Eine Sequenzanalyse von TrD und TC83 zeigte, dass insgesamt 12 Basenaustausche in der RNA vorhanden waren, wodurch insgesamt fünf Aminosäuren im Glycoprotein E2 und eine Aminosäure im Glycoprotein E1 verändert wurden [58].

1.3.2 Das Westliche Pferdeenzephalitis-Virus (WEEV)

Das Westliche Pferdeenzephalitis-Virus (WEEV, Abbildung 1.7) wurde erstmals 1930 aus dem Gehirn eines erkrankten Pferdes in Kalifornien (USA) isoliert [60]. In den folgenden Jahren traten besonders in dieser Gegend weitere

Fälle von Erkrankungen bei Pferden auf, die sich auch auf weitere Staaten im Westen der USA ausbreiteten [61,62]. Im Jahre 1938 wurde erstmals das WEE-Virus aus dem Gehirn eines Menschen isoliert, der an einer Enzephalitis verstorben war [63].

Besonders im Bereich von Kalifornien gab es in den Jahren 1978–1979, 1983–1984, 1993 und 2005–2007 ein häufiges Auftreten von WEEV-Infektionen, allerdings ist die Sterblichkeitsrate bei infizierten Menschen im Vergleich zu VEEV mit 3 bis 4 % relativ gering. Besonders Kleinkinder sind jedoch stark gefährdet, da eine Infektion des Zentralen Nervensystems bleibende Schäden verursachen kann [64]. Auch WEEV zählt als enzephalizides Virus zu den bioterroristischen Agenzien der Kategorie B.

Basierend auf Sequenzanalysen von WEEV kann davon ausgegangen werden, dass sein Ursprung im EEE-Virus (Östl. Pferdeenzephalitis) und im Sindbis-Virus liegt. Die RNA des Capsidproteins weist auf der gesamten Länge eine Sequenzidentität von 85 % mit der RNA des EEE-Virus auf. Die Hüllproteine weisen hingegen eine höhere Homologie mit dem Sindbis-Virus auf, die insgesamt bei 71 % liegt. Dies legt nahe, dass WEEV durch eine Rekombination zwischen Sindbis-Virus und EEE-Virus entstanden sein könnte [65].

2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte und Zubehör

Tabelle 2.1: Geräte – Liste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blot-Apparatur	Blot-Apparatur Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Elektroporator	Mikropulser	Bio-Rad, München
ELISA-Apparaturen	Washer Tecan Columbus pro-Basic Washer Tecan Columbus Plus Reader Tecan SUNRISE	Tecan, Crailsheim Tecan, Crailsheim Tecan, Crailsheim
Geldokumentation	Gel Jet Imager	Intas, Göttingen
Gelelektrophoresekammern	Biotech, Model 40-0708/40-314 Mini Protean III	peqlab Biotech. GmbH Bio-Rad, München
Heizblöcke	Thermomixer comfort Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg
Inkubatoren	BE400 Heizblock Thermomixer comfort Heizblock Thermomixer compact Heizblock 5436 HeraCell (mit CO ₂ -Begasung) Typ BK 3256 Schüttelschrank HAT	Memmert, Schwabach Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Kendro Lab. Product, Hanau Ehret GmbH, Emmendingen Infors AG, Bottmingen –
PCR-Gerät	Thermocycler DNA-Engine	Bio-Rad, München

Tabelle 2.1: Geräte (Fortsetzung)

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
pH-Meter	CG810	Schott, Mainz
Photometer	Nano Drop ND1.000	Peqlab Biotech. GmbH
	Libra S11	Biochrom. Berlin
Pipetten	Research	Eppendorf, Hamburg
	Pipetman	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe	Accu-Jet	Brand, Wertheim
Proteinreinigungssystem	Profinia	Bio-Rad, München
Reinstwasseranlage	Arium 611	Sartorius, Göttingen
Rotierer und Wippen	Rotierapparat RA20	Gerhardt, Königswinter
	Rotier-Heizblock	IKAMAG RCT, Staufen
	Thermoshaker PST-60HL-4	lab4you, Berlin
	Überkopfschüttler CMV 3100	Labortechnik Fröbel GmbH
	GFL 3013	Omnilab Laborzentrum
Sterilwerkbänke	HeraSafe	Heraeus Instr., Braunschweig
	LaminAir HLB 2472	Heraeus Instr., Braunschweig
	MSC-Advantage	Thermo Scientific, Braunschweig
Vortexer	Vortex Genie 1 / 2	Scientific Industries, New York
Waagen	1203 MP	Sartorius, Göttingen
	EMB 220-1	Kern, Balingen-Frommern
	Analytic A 120 S	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	Eppendorf 5810R	Eppendorf, Hamburg
	Eppendorf 5415D	Eppendorf, Hamburg
	Heraeus Instruments Biofuge Pico	Kendro Lab. Product, Hanau
	Sorvall RC5B Plus	Kendro Lab. Product, Hanau
	Sorvall RC6 Plus	Thermo Electron Corp.
	Sorvall RC5 Superspeed	Kendro Lab. Product, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien – Liste der genutzten Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Dialyseschläuche Visking	Carl Roth, Nürnberg
Typ 8/32 MWCO 14 000	
Einwegpipetten Serological pipette	Sarstedt, Nürnberg
(2,5 mL; 5 mL; 10 mL; 25 mL)	
Einwegspatel, steril	VWR, Darmstadt
Elektroporationsküvetten Gene pulser 0,1 cm	Bio-Rad, München

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien (Fortsetzung)

Material	Hersteller
Filter (Celluloseacetat: 0,2 μm ; 0,45 μm ; 0,8 μm)	Sartorius, Göttingen
Filtertips	
100 Biosphere (1000 μL)	Sarstedt, Nürnberg
200 μL	Nerbe Plus, Winsen
FT100 (10 μL)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gelblotting-Papier GB 002	Schleicher-Schuell, Dassel
Kulturschalen	
Schale 94/16	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Petrischale 60x15 mm	Sarstedt, Nürnberg
Mikro-Schraubröhren 2 mL PP	Sarstedt, Nürnberg
MTP – Polypropylen 96 well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
MTP – Polystyrol 96 well (MaxiSorp)	Nunc, Wiesbaden
MTP – Polystyrol Abdeckplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Parafilm	American National Can, Chicago
Pipettenspitze 1000 μL ; 200 μL ; 10 μL	Sarstedt, Nürnberg
Polypropylenröhrchen 50 mL; 15 mL	Corning, Karlsruhe
Polypropylen Mikroplatte 96K U-Form	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PVDF-Membran T830.1	Carl Roth, Nürnberg
Reaktionsgefäß 1,5 mL; 2 mL	Sarstedt, Nürnberg
Säulen für Affinitätschromatographie	
Mab select Protein A	GE Healthcare, München
Resource Q Säule (1 mL)	GE Healthcare, München
Spritzen Braun Injekt 2 mL	B. Braun, Melsungen
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nürnberg

2.1.3 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth, MBI Fermentas, Merck, New England

Biolabs, Sigma-Aldrich (Fluka, Riedel-de Haën) und Roche. Alle Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser hergestellt bzw. verdünnt. Alle Chemikalien und Lösungen wurden vor der Nutzung autoklaviert. Hitzeempfindliche Substanzen wurden nach dem Lösen in Reinstwasser sterilfiltriert.

Tabelle 2.3: Chemikalien, Lösungen und Puffer – Liste der verwendeten Chemikalien, Lösungen und Puffer sowie deren Zusammensetzungen

Bezeichnung, Name	Komponente, Konzentration
Allgemein	
Glycerin	Glycerin steril, 90 % (v/v)
PBS	NaCl, 2,9 M Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O, 150 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 50 mM
Tween 20	Tween 20 (Fluka), 0,05 – 0,1 % (v/v)
Affinitätschromatographie (Protein A, Profinia)	
20 % Ethanol	Ethanol (technisch), 20 % (V/V)
1x Binde-, Wasch- und Equilibrierungspuffer bzw. Entsalzungspuffer (pH 7,4)	NaCl, 137 mM KCl, 2,7 mM Na ₂ HPO ₄ , 4,3 mM NaH ₂ PO ₄ , 8,1 mM
1x Elutionspuffer (pH 3,0)	Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇), 100 mM
1x Lagerungslösung	Benzylalkohol (C ₇ H ₈ O), 2 % (v/v)
1x Reinigungslösung 1 (pH 8,0)	NaCl, 500 mM Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃), 50 mM
1x Reinigungslösung 2 (pH 4,5)	NaCl, 500 mM Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂), 100 mM
Agarose-Gelelektrophorese	
Agarosegel	Agarose in 1x TAE-Puffer, 0,7 – 1,5 %
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid, 25 mM
6x Ladepuffer	Ladepuffer (Fermentas), 6x
1x TAE-Laufpuffer (pH 8,0)	Tris-HCl, 4 mM Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂), 2 mM EDTA, 1 mM

Tabelle 2.3: Chemikalien, Lösungen und Puffer (Fortsetzung)

Bezeichnung, Name	Komponente, Konzentration
Coomassie-Färbung	
Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R250, 0,05 % Essigsäure, 10 % (v/v)
Entfärbelösung	Essigsäure, 10 % (v/v)
ELISA	
Blocklösung	Milchpulver, 2 % (w/v) in PBS
Substratlösung (TMB)	TMB A : TMB B, 20:1
TMB Lösung A (pH 4,1)	Kaliumcitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{K}_3\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$), 30 mM Zitronensäure ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), 52 mM
TMB Lösung B	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin ($\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2$), 1 mM Aceton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), 10 % (v/v) Ethanol, 90 % (v/v) H_2O_2 , 0,3 % (v/v)
Stopplösung	Schwefelsäure (H_2SO_4), 0,5 M
Immunblot (AP-konj. Nachweis-AK)	
BCIP-Lösung	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat, 50 mM Dimethylformamid, 100 % (v/v)
Blocklösung	Milchpulver, 2 % (w/v) in PBS
1x Laufpuffer (pH 8,3)	Glycin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$), 192 mM Tris, 25 mM
Methanol	Methanol, 100 %
NBT-Lösung	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid. 36,7 mM Dimethylformamid, 70 %
Substratpuffer (pH 9,5)	Tris-HCl, 100 mM MgCl_2 , 0,5 mM
Phagen-Display	
Blocklösung	Milchpulver, 2 % (w/v) in PBS
Panningblock	Milchpulver, 1 % (w/v) BSA, 1 % Tween 20, 0,1 % in PBS

Tabelle 2.3: Chemikalien, Lösungen und Puffer (Fortsetzung)

Bezeichnung, Name	Komponente, Konzentration
Trypsin-Lösung	Trypsin, 1 mg/mL in PBS
Plasmid-DNA Fällung	
Isopropanol	Isopropanol, 100 %
70 % Ethanol	Ethanol (analytisch), 70 % (v/v)
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
5 x Laemmli-Puffer	β -Mercaptoethanol, 15 % (v/v) Bromphenolblau, 0,02 % (w/v) Glycerin 50 % (v/v) SDS 10 % (w/v)
Acrylamidmix	Acrylamid, 30 % (w/v) Bisacrylamid, 0,8 % (w/v)
APS-Lösung	Ammoniumpersulfat, 10 % (w/v)
SDS-Laufpuffer (pH 8,3)	Glycin, 192 mM SDS, 0,1 % (w/v) Tris-HCl. 25 mM
SDS-Lösung	SDS, 10 % (w/v)
Sammelgelpuffer	Tris-HCl pH 6,8, 1 M
Trenngelpuffer	Tris-HCl pH 8,8, 1,5 M

2.1.4 Medien und Supplemente

Die zur *E. coli*-Kultivierung genutzten Medien und Supplemente wurden durch Autoklavieren (20 Minuten bei 121 °C) sterilisiert. Hitzeempfindliche Komponenten wurden sterilfiltriert und den Medien nach dem Autoklavieren zugesetzt. Die Lösungen zur Kultivierung von Mammalia-Zellen wurden steril geliefert oder sterilfiltriert.

Tabelle 2.4: Medien und Lösungen für *E. coli* – Tabelle der für *E. coli* genutzten Medien und zusätzlichen Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
SOC Flüssigmedium (pH 7,0)	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,05 % (w/v) NaCl 20 mM Mg ²⁺ -Lösung 20 mM Glucose Glucoselösung und Mg ²⁺ -Lösung nach dem Autoklavieren hinzugeben
Mg ²⁺ -Lösung (2 M)	1 M MgCl ₂ , 1 M MgSO ₄ in H ₂ O lösen und autoklavieren
Glucoselösung (2 M)	2 M Glucose in entsprechendem Volumen H ₂ O lösen und sterilfiltrieren. Autoklavieren vermeiden
2x YT-Agar	1,5 % (w/v) Bacto-Agar Agar in 800 mL 2x YT-Flüssigmedium
2x YT Flüssigmedium (pH 7,0)	1,6 % (w/v) Trypton 1,0 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl in entsprechendem Volumen H ₂ O lösen und autoklavieren

Tabelle 2.5: Medien und Lösungen für Mammalia-Zellen – Tabelle der für die Kultivierung von Mammalia-Zellen genutzten Medien und zusätzlichen Lösungen

Lösung / Puffer	Herkunft
1x DMEM	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Fötales Kälberserum (FCS), IgG-stripped	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Trypsin/EDTA (1 x)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Penicillin/Streptomycin (100 x), 10 mg/mL	PAA Laboratories GmbH, Österreich
PEI (Polyethylenimin), 25 kDa, linear	Polysciences, Eppelheim

2.1.5 Bakterien, Säugerzelllinien und Bakteriophagen

Tabelle 2.6: Bakterien, Säugerzelllinien und Bakteriophagen – Liste der genutzten Bakterien, Säugerzelllinien und Bakteriophagen mit den jeweiligen Eigenschaften, ggf. sind Genotyp, Eigenschaften und Herkunft, sowie Referenzen angegeben.

Organismus	Genotyp, Eigenschaften	Herkunft, Referenz
<i>E.coli</i> XL1-Blue MRF'	$\Delta(\text{mcrA})183$ $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' $\text{pro-AB lacI}^q\text{Z}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^r\text{)]}$	Stratagene, La Jolla, USA
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzellen, adherent wachsend, transformiert mit SV40 <i>Large-T-Antigen</i>	ATCC-Nr.: CRL-11268 [66]
Helferphage M13K07	Bakteriophage zur Co-Infektion von Phagemid-tragenden Bakterien	GE Healthcare, München [32]
Helferphage Hyperphage	Bakteriophage mit Deletion im pIII-Gen zur Co-Infektion von Phagemid-tragenden Bakterien	Progen Biotechnik, Heidelberg [33]

2.1.6 Plasmide und Phagemide

Tabelle 2.7: Plasmide und Phagemide – Liste der genutzten Plasmide und Phagemide

Plasmid	Beschreibung / Verwendungszweck
pCMX2.5-hIgG1-Fc-XP	Eukaryotischer Expressionsvektor, Produktion von scFv-Fc-Antikörpern
pHAL14	Phagemid-Vektor, Klonierung von Antikörpergenbibliotheken, Phagen-Display

2.1.7 Oligonukleotide

Tabelle 2.8: Oligonukleotide – Liste der genutzten Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5' – 3'
Amplifikation der V _H -Antikörpergensequenzen aus dem pGEM-T Vektor (2. PCR)	
MHMacVH-NcoI_f1.1	GTCTCTCGCA CCATGGCCS AGGTGCAGC TGGTGSAGT CTGGG
MHMacVH-NcoI_f2	GTCTCTCGCA CCATGGCCC AGGTGCAGC TRCTCGAGT CKGG
MHMacVH-NcoI_f3	GTCTCTCGCA CCATGGCCS AGGTGCAGC TGCTCGAGT CKGG
MHMacVH-NcoI_f4	GTCTCTCGCA CCATGGCCC AGGTACAGC TCGAGCAGT CAGG
MHMacVH-NcoI_f5.1	GTCTCTCGCA CCATGGCCG AGGTGCAGC TGCTCGAGT CTGG
MHMacVH-NcoI_f6	GTCTCTCGCA CCATGGCCC AGGTGCAGC TRCTCGAGT SGGG
MHMacIgGCH1scFv-HindIII_r	GTCTCTCGCA AAGCTTTGG GCCCTTGGT GGA
Amplifikation der V _L (κ)-Antikörpergensequenzen aus dem pGEM-T Vektor (2. PCR)	
MHMacVK-MluI_f1	ACCGCCTCC ACGCGTAGA HATCGAGCT CACNCAGTC TCC
MHMacVK-MluI_f6	ACCGCCTCC ACGCGTAGA GCTCCWGAT GACMCAGTC TCC
MHMacKappaCL-NotI_r:	ACCGCCTCC GCGGCCGCG ACAGATGGT GSAGCCAC
Sonstige Oligonucleotide	
MhgIII_r	CCTTTCTGC TGTTTTGAA ATC
MhlacZpro_f	GGCTCGTAT GTTGTGTGG
MKpelB_f	GCCTACGGC AGCCGCTGG
ToR-pCMV-mIgG1-Fc-seq_f	CACTTTGCC TTTCTCTCC
CM2	CGCAAATGG GCGGTAGGC GTG
ToR-pCMV-Seq-R	CGCCTCAGA AGCCATAGA G

2.1.8 Enzyme und entsprechende Puffer

Tabelle 2.9: Enzyme und entsprechende Puffer – Liste der verwendeten Enzyme und Pufferlösungen

Enzym / Puffer	Hersteller
BSA analytisch 100x	New England BioLabs (NEB)
Calf intestinal phosphatase (CIP)	New England BioLabs (NEB)
CIAP-Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes, Keilaranta
Phusion HF Reaktionspuffer 5x	Finnzymes, Keilaranta
RedTaq DNA-Polymerase	Sigma, St. Louis
RedTaq PCR Reaktionspuffer 10x	Sigma, St. Louis
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs (NEB); MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktions-Puffer NEB 1 – 4	New England BioLabs (NEB)
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA-Ligase	Promega, Mannheim
T4 DNA-Ligase Puffer 10x	Promega, Mannheim
Trypsin	Sigma, München

2.1.9 Kommerzielle Antikörper

Tabelle 2.10: Kommerzielle Antikörper – Liste der verwendeten kommerziellen Antikörper

Antikörper	Hersteller
Maus-anti-C-Myc-tag (9E10/21)	AG Dübel
Maus-anti-pIII	MoBiTec, Berlin
Streptavidin-AP-konj.	GE Healthcare, USA
Streptavidin-HRP-konj.	GE Healthcare, USA
Ziege-anti-Maus-IgG Fc-spezifisch AP-konj.	Sigma-Aldrich, München
Ziege-anti-Maus IgG Fc-spezifisch HRP-konj.	Sigma-Aldrich, München
Ziege-anti-Mensch-IgG Fc-spezifisch AP-konj.	Sigma-Aldrich, München
Ziege-anti-Mensch-IgG Fc-spezifisch HRP-konj.	Sigma-Aldrich, München

2.1.10 Kit-Systeme

Tabelle 2.11: Kit-Systeme – Liste der genutzten Kit-Systeme

Kit-Bezeichnung	Hersteller
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel
ZR Plasmid Miniprep-Classic	Zymo Research

2.1.11 Software und Datenbanken

Tabelle 2.12: Software und Datenbanken – Liste der verwendeten Programme und Datenbanken

Software/Datenbank	Anwendung	Anbieter
Finch TV 1.3.1	Darstellung und Auswertung von DNA-Sequenzierdaten	Geospiza Inc.
LibreOffice 3.3	Text-, Bild-, Tabellenbearbeitung	LibreOffice [67]
MultAlign	Sequenzvergleich	Corpet 1988 [68]
NCBI	Literatur, DNA- und Proteinsequenzen, Sequenzvergleich	National Center for Biotechnology Information [69]
VBASE2	Analyse von Antikörpersequenzen	Retter et al. 2005 [70]
Vector NTI Suite 10	Erstellen und Ansicht von Vektorkarten	Erstellen und Ansicht von Vektorkarten
L ^A T _E X 2 _ε	Textsatz	Latex-Project [71]
GIMP	Bildbearbeitung	gimp.org [72]
Inkscape	Vektorzeichnungen	inkscape.org [73]

2.1.12 DNA- und Proteinstandards

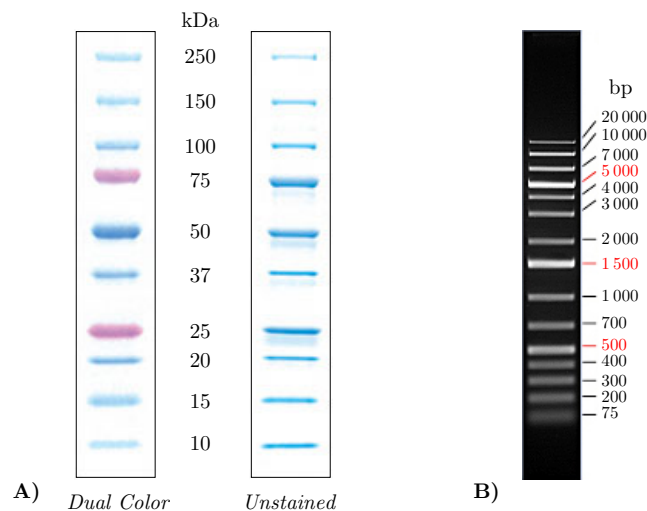


Abbildung 2.1: Protein- und DNA-Längenstandards – A) Precision Plus Protein Standards unstained/dual color (Bio-Rad), B) GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde gemäß den Herstellerangaben mit dem NucleoSpin Plasmid (später ZR Plasmid Miniprep-Classical) oder dem Nucleobond Xtra Midi Kit aus 5 bzw. 100 mL Übernachtskulturen von *E. coli*-Flüssigkulturen isoliert und gereinigt. Die Elution der DNA erfolgte mit Elutionspuffer (10 mM Tris; pH 8,0) oder dH₂O. Die Reinheit und die DNA-Konzentration wurden abschließend mittels NanoDrop ND 1.000 bestimmt. Eine Absorption von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm entsprach dabei einer DNA-Konzentration von 50 ng/μL (doppelsträngige DNA). Der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm wurde ebenfalls bestimmt, um die Reinheit der DNA zu bestimmen. Bei Werten von 1,8–1,9 wurde die DNA für weitere Arbeiten genutzt.

2.2.2 Amplifikation von DNA

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [74] wurde dazu genutzt, um spezifische DNA-Abschnitte exponentiell zu amplifizieren. Zur Bestimmung des zu amplifizierenden Abschnittes wurden flankierende, komplementäre Oligonukleotide eingesetzt. In dieser Arbeit wurden präparative PCRs durchgeführt, außerdem wurden mit der Kolonie-PCR Bakterieneinzelkolonien untersucht, ob diese das gewünschte DNA-Fragment enthalten. Die jeweiligen PCR-Methoden und deren Zusammensetzungen sowie Temperaturverläufe sind im Folgenden beschrieben.

PCR – allgemein

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurden PCRs mit der Phusion DNA-Polymerase durchgeführt. Hierbei wurden mittels Kit-Systemen gereinigte Matrizen-DNA und zwei unterschiedliche DNA-Polymerasen mit den zugehörigen Puffern verwendet.

Tabelle 2.13: Ansatz und Temperaturprofil einer PCR-Reaktion – Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung einer PCR-Reaktion mit der Phusion oder RedTaq-DNA-Polymerase mit den entsprechenden Puffern (links) und das Temperaturprofil einer PCR-Reaktion (rechts).

Komponente	Volumen (μL)	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit (sec)	Zyklen
Matrizen-DNA (0,1 – 10 ng)	x	94 / 98	60	1
Primer fwd 10 μM	0,5	94 / 98	15	} 20 – 30
Primer rev 10 μM	0,5	50 – 72	20	
dNTPs je 10 mM	1	72	10 – 120	
HF-Puffer (5x) oder RedTaq Puffer (10x)	5 / 10	72	600	1
Phusion oder RedTaq Polymerase	0,5 / 1			
dH ₂ O	<i>ad</i> 50 μL			

Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR stellt einen Spezialfall der PCR dar, da in diesem Fall keine gereinigte DNA eingesetzt wird. Hierbei wurde eine Bakterienkolonie als DNA-Matrize eingesetzt; im ersten Zyklus wurden die Zellen durch lang anhaltende hohe Temperaturen zerstört und die DNA dadurch zugänglich gemacht. Besonders nach einer Klonierung können über die Kolonie-PCR sehr schnell große Mengen an Einzelkolonien auf das Vorhandensein des gewünschten Plasmids untersucht werden.

Tabelle 2.14: Ansatz und Temperaturprofil einer Kolonie-PCR-Reaktion – Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung einer Kolonie-PCR-Reaktion mit der RedTaq-DNA-Polymerase (links) und das Temperaturprofil einer PCR-Reaktion (rechts).

Komponente	Volumen (μL)	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit (sec)	Zyklen
Bakterienkolonie	-	96	120	1
Primer fwd 10 μM	0,5	94	15	} 20–30
Primer reve 10 μM	0,5	50–72	20	
dNTPs je 10 mM	1	72	10–120	
RedTaq-Puffer (10x)	10	72	600	1
RedTaq Polym., 1U/ μL	1			
dH ₂ O	ad 50 μL			

2.2.3 Reinigung von DNA

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Lösungen wie PCR-Ansätzen oder aus Agarosegelen erfolgte mittels NucleoSpin Extract II Kit gemäß der Herstellerangabe. Die DNA wurde in 10–50 μL Elutionspuffer (10 mM Tris, pH 8,0) oder 10–50 μL dH₂O eluiert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mittels NanoDrop ND 1.000 bestimmt und die Reinheit überprüft.

2.2.4 Präzipitation von DNA

Nach enzymatischen Reaktionen wie z.B. Ligationen kann DNA mittels Präzipitation gereinigt werden. Dazu wurde die DNA-Lösung auf 100 μL aufgefüllt und 10 μL 3 M Natrium-Acetat-Lösung und 250 μL 100 % Ethanol hinzugefügt. Nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung für 5 Minuten bei 16 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 200 μL 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet in dem gewünschten Volumen (10–50 μL) Puffer oder dH₂O gelöst.

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Proben im elektrischen Feld nach Größe und Konformation aufgetrennt. Dazu wurden 1–2 % Agarose in entsprechendem Volumen 1x TAE-Puffer gekocht und gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 60 °C wurde der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid hinzugefügt und die Gele gegossen. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden DNA enthaltende Proben (2–50 μL) in die Taschen des Gels gefüllt und zusätzlich ein DNA-Längenstandard (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder) in eine weitere Geltasche gefüllt. Bei 75–130 V und 400 mA erfolgte die Auftrennung für 15–40 Minuten. Im Anschluss wurde die aufgetrennte DNA mittels UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration gereinigter DNA-Lösungen wurde photometrisch am NanoDrop ND 1.000 bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Dabei entsprach eine Absorption von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm einer DNA-Konzentration von 50 ng/ μL (doppelsträngige DNA). Der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm wurde ebenfalls bestimmt, um die Reinheit der DNA zu bestimmen. Bei Werten von 1,8–1,9 wurde die DNA für weitere Arbeiten genutzt.

2.2.7 Enzymatische Restriktion von DNA

Zum Schneiden von DNA wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen verwendet, welche sequenzgenaues Schneiden innerhalb einer spezifischen Erkennungsstelle erlauben. Dabei wird nach analytischer und präparativer Restriktion unterschieden, wobei die analytische Restriktion die Überprüfung der eingesetzten DNA erlaubt, nach einer präparativen Restriktion können die geschnittenen DNA-Fragmente zu einer Klonierung eingesetzt werden. Es wurden bis zu zwei unterschiedliche Restriktionsendonukleasen gleichzeitig eingesetzt, um eine bestimmte Menge DNA ($1-10\text{ }\mu\text{g}$) bei optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen zu schneiden. Die Restriktionen wurden je nach eingesetzten Enzymen und DNA-Konzentrationen angesetzt, die Inkubationszeit wurde analog dazu eingestellt. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Inaktivierung der Enzyme durch Erhitzen beendet. Im Fall von Plasmid-DNA konnte vor dem Erhitzen zusätzlich eines der Enzyme CIP oder SAP hinzugegeben werden, um die Enden der DNA zu dephosphorylieren.

Tabelle 2.15: Zusammensetzung einer Restriktion – Die Tabelle zeigt einen Standardansatz für eine enzymatische Restriktion von DNA.

Komponente	Volumen (μL)
DNA ($1-10\text{ }\mu\text{g}$)	x
Restriktionsenzym 1 (z.B. NcoI) $10\text{ U}/\mu\text{L}$	1
Restriktionsenzym 2 (z.B. NotI) $10\text{ U}/\mu\text{L}$	1
10x Reaktionspuffer (z.B. NEB Puffer 3)	3
dH ₂ O	<i>ad</i> 50

2.2.8 DNA-Dephosphorylierung

Um eine Religation geschnittener DNA zu verhindern, wurden die DNA-Enden von Vektoren dephosphoryliert. Dazu wurde das Enzym CIP (*calf intestinal phosphatase*) bzw. SAP (*Shrimp alkaline phosphatase*) eingesetzt. Beide Enzyme entfernen endständige 5'-Phosphatgruppen und machen somit eine Religation linearisierter DNA-Fragmente mit sich selbst unmöglich. Vor einer

thermischen Inaktivierung einer Restriktion wurden 0,5 μL des entsprechenden Enzyms direkt in den Ansatz gegeben und die Inkubation des Ansatzes bei 37°C für 30 Minuten fortgesetzt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Bei einer Dephosphorylierung mit SAP wurden alle Enzyme bei 65°C für 15 Minuten inaktiviert. Bei Nutzung von CIP musste die DNA direkt im Anschluss gereinigt werden, um das Enzym aus dem Ansatz zu entfernen, da sich dieses auch mit längerer Inkubation bei höheren Temperaturen nicht vollständig inaktivieren lässt.

2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

In einer Ligation werden geschnittene DNA-Fragmente, welche komplementäre Enden aufweisen, mithilfe einer Ligase (Hier: T4-DNA-Ligase) unter ATP-Verbrauch miteinander verbunden. Die Ligationen erfolgten meist bei 16°C über Nacht, allerdings sind auch Ligationen bei RT für 1 h oder über ein Wochenende bei 4°C möglich. Die Zusammensetzung der Ansätze wurde auf ein molares Verhältnis zwischen Insert und Vektor von 3:1 eingestellt. Zur Berechnung der DNA-Mengen wurde folgende Formel eingesetzt:

$$\frac{m_{\text{Vektor}} \cdot l_{\text{Insert}}}{l_{\text{Vektor}}} \cdot \underbrace{\left\langle \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} \right\rangle}_{\text{molares Verhältnis}} = m_{\text{Insert}}$$

Die typische Zusammensetzung von zwei Ligationsansätzen ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2.16: Ligationen – Die Tabelle zeigt die Ligationsansätze für eine Standardklonierung und die Klonierung einer Antikörpergenbibliothek

Komponente	Normale Klonierung		Antikörpergenbibliothek	
	Volumen (μL)	Menge	Volumen (μL)	Menge
10 x Reaktionspuffer	1	1 x	10	1 x
T4-DNA-Ligase	0,33	1 U	1	3 U
Vektor DNA	1–2	50 ng	10–20	1 000 ng
Insert DNA	1–5	20–100 ng	10–50	750 ng
dH ₂ O	ad 10 μL		ad 100 μL	

2.2.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde von der Firma GATC Biotech AG durchgeführt. Die DNA und zur Sequenzierung nötige Oligonukleotide wurden in der gewünschten Qualität und Konzentration verpackt und verschickt. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mithilfe des Programms FinchTV (Geospiza) und den Onlineplattformen MultAlign [68] und VBASE2 [70] kontrolliert und ausgewertet.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von *E. coli*-Zellen

Soweit nicht anders vermerkt, wurden *E. coli*-Zellen bei 37 °C und 250 rpm in 2xYT-Medium bzw. auf 2xYT-Agar unter aeroben Bedingungen kultiviert. Je nach vorhandenen Resistenzen wurden den Medien Antibiotika hinzugefügt. Die Kultivierungszeit betrug meist 14–18 h.

2.3.2 Lagerung von Bakterienkulturen

Zur kurzfristigen Lagerung von *E. coli*-Kulturen wurden diese in einer Kulturschale mit 2xYT-Agar und den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 4 °C aufbewahrt. Für eine Sicherung der Bakterien wurden 800 µL einer über Nacht inkubierten Bakterienkultur mit 200 µL 90 % Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Transformation von *E. coli*-Zellen

Mittels Elektroporation oder Hitzeschock wurden *E. coli*-XL1-Blue MRF'-Zellen mit Plasmid-DNA transformiert. Für die Elektroporation wurde 1 µL eines Ligationsansatzes mit 5 µL elektrokompenten Zellen und 44 µL dH₂O vermischt. Die Elektroporation erfolgte durch einen elektrischen Spannungsimpuls

von 1,7 kV für 4–6 ms. Nach Zugabe von 950 μL vorgewärmtem SOC-Medium wurden die Zellen bei 600 rpm und 37 °C für 1 h inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde das Pellet in 100 μL resuspendiert und Aliquots (10 und 90 μL) auf Selektivagar (2 x YT-GA) ausplattiert und über Nacht inkubiert.

Bei der Hitzeschock-Transformation wurde der gesamte Ligationsansatz mit 50 μL chemisch kompetenten XL1-Blue MRF'-Zellen vermischt und für 10–20 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für exakt 1 Minute bei 42 °C, anschließend wurden die Zellen erneut für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 950 μL SOC-Medium wurden die Zellen bei 600 rpm und 37 °C für 1 h inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde das Pellet in 100 μL resuspendiert und Aliquots (10 und 90 μL) auf Selektivagar (2 x YT-GA) ausplattiert und über Nacht inkubiert.

2.3.4 Herstellung der Immunantikörpergenbibliotheken

Zur Herstellung von drei anti-VEEV bzw. -WEEV Antikörpergenbibliotheken wurde jeweils ein männlicher Makake (*Macaca fascicularis*) in zeitlich definierten Abständen sechs Mal mit β -Propiolacton-inaktivierten Viruspartikeln immunisiert. Nach der Kontrolle des Serums auf neutralisierende Antikörper wurden Lymphozyten aus dem Knochenmark der Makaken isoliert. Mittels Tri Reagenz (*Molecular Research Center Inc*, Cincinnati, USA) wurde daraus die RNA isoliert und mittels Superscript II Kit und oligo (dT) (Invitrogen, USA) in cDNA umgeschrieben. Durch die Nutzung von diversen Kombinationen an Oligonukleotiden [75, 76] wurden die kodierenden Regionen der variablen Regionen $V_L\kappa$ und V_H amplifiziert und nach Herstellerangaben in den Vektor pGEM-T (Promega, Madison, Wisconsin) kloniert. Dadurch wurden für alle zu generierenden Antikörpergenbibliotheken jeweils zwei Subbibliotheken erhalten, welche die schweren Ketten (Fd-Fragment), bzw. die leichten Ketten des Typs κ enthielten. Diese Arbeiten wurden durch P. Thullier am Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, La Tronche, Frankreich gemäß der tierschutzrechtlichen Verordnungen durchgeführt.

Die im pGEM-T Vektor vorhandenen Antikörpergensequenzen wurden durch zwei spezifische Oligonukleotid-Sets [75] neu amplifiziert, wobei Restriktionschnittstellen zur Klonierung in den Vektor pHAL14 angefügt wurden. Die Konstruktion wurde im Folgenden so, wie schon von [77,78] zuvor beschrieben wurde, durchgeführt. Dabei wurden die Ansätze strikt getrennt gehalten, um die Diversität nicht zu verringern. Jede PCR wurde in 100 μL durchgeführt, wobei 100 μg gereinigter pGEM-T-Vektor als Matrize, 4 U RedTaq Polymerase, 200 μM dNTPs und 200 nM jedes Oligonukleotids eingesetzt wurden. Die PCR wurde in 20 Zyklen (30 s 94 °C, 30 s 57 °C, 30 s 72 °C) durchgeführt und die PCR-Produkte mittels 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel geschnitten und die enthaltene DNA mit dem NucleoSpin Extract II Kit nach den Herstellerangaben extrahiert.

Die Konstruktion der Antikörpergenbibliotheken erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden die V_L -Gensequenzen in den pHAL14-Vektor [79] kloniert, im zweiten Schritt folgte die Klonierung der V_H -Gensequenzen. Dazu wurden 5 μg des Vektors und 2 μg der isolierten V_L -Gensequenzen mit 50 U NotI und 50 U MluI (NEB, Frankfurt) in einem 100 μL Ansatz über Nacht bei 37 °C verdaut. Die enzymatische Reaktion wurde durch Erhitzen auf 65 °C für 10 Minuten gestoppt. Nach der Inaktivierung der Enzyme folgte die Dephosphorylierung des geschnittenen, linearisierten Vektors mittels 0,5 U CIP für 30 Minuten bei 37 °C, nach erneuter Zugabe von 0,5 U CIP für weitere 30 Minuten wurden Vektor und V_L -Fragment mit dem Nucleospin Extract II Kit nach Herstellerangaben gereinigt. Es wurden 270 ng V_L -Genfragmente mit 1 μg dephosphoryliertem Vektor in einem Ligationsansatz gemischt, zu dem 1 U T4-DNA-Ligase hinzugegeben wurde. Nach einer Inkubation ü. N. bei 16 °C wurden die DNA der Ligationsansätze durch Zugabe von Ethanol und Na-Acetat gefällt und das Pellet zwei Mal mit 70 % Ethanol gewaschen. Die gesamten Ansätze wurden zur Elektroporation von 25 μL XL1-Blue MRF' *E. coli*-Zellen genutzt und die transformierten Bakterien auf 2 x YT-GA Agarplatten (25 cm Petrischalen) ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die Bakterienkolonien durch Zugabe von 40 mL 2 x YT-Medium mit einem Drigal-

skispatel gelöst. Im Anschluss wurde Plasmid-DNA mithilfe des NucleoBond Plasmid Midi Kits nach Herstellerangaben aus den Bakterienzellen isoliert.

Im zweiten Schritt wurden $5\text{ }\mu\text{g}$ der V_L -Bibliothek und $1,5\text{ }\mu\text{g}$ der V_H -Genfragmente mit je 50 U HindIII und 50 U NcoI in einem $100\text{ }\mu\text{L}$ -Ansatz für 2 h bei 37°C verdaut. Die enzymatische Reaktion wurde durch Erhitzen auf 65°C für 10 Minuten gestoppt und weitere 50 U HindIII wurden für eine Übernacht-Inkubation hinzugefügt. Die weiteren Schritte wurden analog zu der V_L -Klonierung durchgeführt, wobei bei der Ligation 250 ng der verdauten und gereinigten V_H -Genfragmente genutzt wurden. Insgesamt wurden zwei Transformationen durchgeführt und vereinigt. Die abgeschwemmten Bakterien wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert und enthielten die erstellte Antikörpergenbibliothek.

2.3.5 Infektion von *E. coli* und Produktion von M13K07- und Hyperphage-Antikörperphagen

Für das Phagen-Display wurden die erstellten Immunantikörpergenbibliotheken separat in Phagen verpackt. Dazu wurden 400 mL $2\times\text{YT-GA-Medium}$ mit einem der gesicherten Glycerin-Stocks beimpft und bei 37°C und 250 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von $0,4-0,6$ inkubiert. Zu 25 mL der Kultur (entspricht etwa $1,25\cdot 10^{10}$ Bakterienzellen) wurden $2,5\cdot 10^{10}$ Helferphagen (Hyperphage [33] bzw. M13K07 [32]) hinzugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C ohne Schütteln wurden die Lösungen weitere 30 Minuten bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Die infizierten Zellen wurden durch eine Zentrifugation bei $3\,220\text{ g}$ für 10 Minuten pelletiert und in 400 mL $2\times\text{YT-AK}$ resuspendiert. Die Phagenproduktion erfolgte bei 30°C und 250 rpm über Nacht (mindestens 16 h). Nach der Produktion wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation für 20 Minuten bei $10\,000\text{ g}$ pelletiert und der Überstand entnommen. Zur Fällung der Phagenpartikel wurde $1/5$ des Volumens 20% Polyethylenglycol (PEG) / $2,5\text{ M NaCl}$ hinzugegeben und für 1 h bei leichtem Schütteln auf Eis inkubiert. Die Präzipitation erfolgte bei $10\,000\text{ g}$ und 4°C für 1 h. Die Phagenpartikel wurden nach Entfernung des Überstands in $10\text{ mL Phage Dilution-Puffer}$ aufgenommen und erneut mit $1/5$ des Volumens 20% PEG / $2,5\text{ M NaCl}$

inkubiert und für 30 Minuten bei 10 000 *g* und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 1 mL *Phage Dilution*-Puffer resuspendiert, verbliebene Bakterienzellen und Zelltrümmer wurden durch eine erneute Zentrifugation für 5 Minuten bei 16 000 rpm und Raumtemperatur entfernt. Der Antikörperphagen enthaltende Überstand wurde bei 4 °C gelagert, und eine Titration der Phagenpartikel wurde vorgenommen [80]. Zur Kontrolle der Präsentation von scFv-Fragmenten auf den Phagenpartikeln wurde eine SDS-PAGE und ein Western Blot mit anschließender anti-pIII-Immunfärbung (Maus-anti-pIII 1:2 000, Ziege-anti-Maus IgG AP-konj. 1:10 000) durchgeführt. Das Wildtyp-pIII besitzt eine kalkulierte Größe von etwa 42,5 kDa, allerdings wird es durch sein apparentes Laufverhalten in der SDS-PAGE bei 65 kDa detektiert [81]. Entsprechend kann das scFv::pIII Fusionsprotein bei 95 kDa detektiert werden.

2.3.6 Titerbestimmung von M13- und Hyperphage-Antikörperphagen

Für eine Titration der Antikörperphagen wurde eine *E. coli*-Bakterienkultur bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,4–0,6 inkubiert. Mit 10 μ L von Verdünnungen der produzierten bzw. nach einer *Panning*-Runde eluierten Phagen wurden jeweils 50 μ L Bakterienzellen infiziert und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Mit 3 x 10 μ L wurden Triplikate jeder genutzten Phagenverdünnung auf 2 x YT-GA Agarplatten aufgetropft und getrocknet. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C konnten Kolonien auf den Agarplatten gezählt und somit die cfu (*colony forming units*) der jeweiligen Verdünnungen ermittelt werden.

2.3.7 Selektion mit Antikörperphagenbibliotheken

Die Selektion von VEEV- und WEEV-spezifischen Antikörpern wurde entsprechend der Beschreibung in [82] durchgeführt, wobei leichte Modifikationen vorgenommen wurden. Die *Pannings* wurden in Immunröhrchen durchgeführt, zur Immobilisierung der Viren dienten die VEEV-spezifischen mAKs VEE MH2 und 8747 (die mAKs wurden in Kombination eingesetzt) der Bundes-

wehr, sowie der WEEV-spezifische mAK 8742 der Bundeswehr. Die Immunröhrchen wurden mit Vero/VRS (VRS-gereinigter Überstand nicht infizierter Vero-Zellen), bzw. den jeweiligen spezifischen mAKs über Nacht bei 4 °C beschichtet. Dabei wurden je zwei Kavitäten pro durchgeführtem *Panning* genutzt, um die Selektionsoberfläche zu vergrößern. Anschließend erfolgte die Blockierung der freien Bindestellen mit 2 % MPBST (2 % Milchpulver, 0,1 % Tween 20) oder mit 1 % BSA in PBST für 1 h bei 37 °C. Danach folgte die Bindung des Antigens: Aktive, VRS-gereinigte VEEV- bzw. WEEV-Viruspartikel wurden für 2 h bei RT auf dem Schüttler in den Immunröhrchen mit ihren spezifischen mAKs inkubiert und so immobilisiert. Zur Negativselektion wurden die scFv-präsentierenden Phagen für 1 h bei RT auf dem Schüttler in Vero/VRS-beschichteten Immunröhrchen inkubiert. Zur Reduzierung unspezifischer Bindungen an die Fängerantikörper wurde ein nicht-spezifischer mAK des gleichen Isotyps (Maus IgG D1-4G2-4-15, [83]) zur Negativselektion hinzugegeben. Außerdem erfolgte eine Zugabe von 10 µL Vero Zellkulturüberstand zu den Negativselektionen, bevor sie zur Selektion eingesetzt wurden. Nach dem Waschen der Immunröhrchen und der Blockierung freier Bindestellen für 1 h mit 2 % MPBST wurden die Phagenlösungen aus den Negativselektionen in die Immunröhrchen überführt. Die Selektion wurde für 90 Minuten bei RT auf einem Schüttler durchgeführt. Durch 30 Waschschrte mit PBST wurden die nicht oder nur schwach bindenden Phagen aus den Immunröhrchen entfernt, anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µL Trypsin und eine Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C. Die so eluierten Phagen wurden in ein Schraubröhrchen überführt und 200 µL 0,1 M Glycin-HCl-Puffer pH 2,2 hinzugegeben, um möglicherweise vorhandene Viruspartikel zu inaktivieren. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT auf dem Schüttler wurde die Phagenlösung durch Zugabe von 200 µL 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,6 neutralisiert. Die gesamte *Panning*-Prozedur wurde in den S3-Laboratorien des WIS (Wehrwissenschaftliches Institut für Schutztechnologien, ABC-Schutz, Abteilung Virologie) in Munster durchgeführt, die eluierten Phagen wurden dann zur TU BS geschickt, um die eluierten Phagen zu titern und nach Infektion von *E. coli*-Zellen neue Antikörperphagen für die nächste *Panning*-Runde zu produzieren.

2.3.8 Produktion von löslichen scFv-Fragmenten in Mikrotiterplatten

Zur Identifikation von monoklonalen, bindenden scFvs wurden von den Titrationsplatten der eluierten Phagen nach den *Panning*-Runden 2 und 3 einzelne Kolonien zum Beimpfen von 150 μ L 2xYT-GA-Medium in 96-well PP Mikrotiterplatten (MTPs) genutzt. Die MTPs wurden mit einem Polystyrol-Deckel verschlossen und bei 37 °C und 1 000 rpm in einem MTP-Schüttler mit kleinem Orbit (1–2 mm) inkubiert. Mit 10 μ L der Übernachtskultur wurden 180 μ L frisches, vorgewärmtes 2xYT-GA-Medium beimpft und erneut für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 3 220 *g* pelletiert und 180 μ L Überstand wurden entfernt. Die Pellets wurden resuspendiert in 2xYT-A-Medium, in dem 100 mM Saccharose sowie 50 μ M IPTG zur Induktion der scFv-Produktion vorhanden waren. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 30 °C und 1 000 rpm. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 3 220 *g* pelletiert und die Überstände, welche die scFvs enthielten, wurden in neue PP-Platten transferiert und bei 4 °C bis zur weiteren Analyse gelagert [84].

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Screening-ELISA

Die *Enzyme linked Immunosorbent assays* (ELISAs) zur Untersuchung der monoklonalen spezifischen scFv-Klone wurden in 96 well MTPs (MaxiSorp, Nunc) durchgeführt. Die Immobilisierung der Viren an der Plastikoberfläche und die nachfolgende Inaktivierung der Partikel erfolgte durch die Bundeswehr. Die scFv-enthaltenden Überstände aus der Mikrotiterplatten-Produktion wurden 1:1 mit 2 % MPBST verdünnt und für 1 h bei RT auf einer Wippe in den Kavitäten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST (3 Durchläufe im ELISA Washer Tecan Columbus) wurden die spezifisch bindenden scFvs mit dem

Maus-anti-c-myc IgG 9E10 (1:1 000 in 2 % MPBST verdünnt) für 1 h auf der Wippe inkubiert und erneut gewaschen. Der Nachweis erfolgte mit dem Ziege-anti-Maus-IgG (Fab-spez.)-HRP-konj. (1:10 000 in 2 % MPBST verdünnt), welcher ebenfalls für 1 h bei RT auf der Wippe in den Kavitäten inkubiert wurde. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 100 μ L TMB-Substrat hinzugefügt und je nach Farbintensität 5–20 Minuten bei RT auf der Wippe inkubiert. Durch die Zugabe von 100 μ L 0,5 M H_2SO_4 wurde die enzymatische Reaktion gestoppt und es erfolgte ein Farbumschlag von Blau zu Gelb. Die Absorption bei $\lambda=450$ nm (Referenzmessung bei $\lambda=620$ nm) wurde abschließend je well im Tecan Sunrise bestimmt.

Capture-ELISA

Da das Virusmaterial in vielen Fällen nicht komplett gereinigt zur Verfügung stand, wurde ebenfalls ein *Capture*-ELISA durchgeführt. Insbesondere für die Experimente der WEEV-spezifischen scFv-Fc-Antikörper, in denen die Eignung als Fänger- bzw. Detektor-Antikörper bestimmt wurde, wurde dieses Verfahren eingesetzt. Dazu wurden 300 ng eines scFv-Fc-Antikörpers in den Kavitäten einer MTP immobilisiert und nach dem Blockieren mit PBS-F (PBS mit 1 % FCS) Viruspartikel enthaltender Zellkulturüberstand (aktive bzw. inaktivierte Viren) inkubiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einer Wippe. Bei Experimenten mit VEE-Viruspartikeln wurden die Kavitäten abschließend mit *Liquid Plate Sealer* (Candor) versiegelt, die WEEV-beschichteten Platten wurden nicht weiter behandelt. Diese Platten konnten für bis zu sechs Wochen bei 4 °C gelagert werden. Die Bestimmung der Eignung als Nachweisantikörper erfolgte durch Inkubation der jeweiligen scFv-Fc-Antikörper oder mAKs in verschiedenen Konzentrationen für 3 h bei RT auf der Wippe. Der Nachweis erfolgte bei biotinylierten Antikörpern mittels Streptavidin-HRP (1:4 000 in PBS-F), bei den scFv-Fc-Antikörpern mittels Ziege-anti-human IgG Fc-spez. HRP-Konjugat (1:25 000 in PBS-F). Die Entwicklung erfolgte analog zum *Screening*-ELISA.

Human Capture-ELISA

Zur Bestimmung der Konzentrationen von scFv-Fc-Antikörpern nach der Produktion in Mammalia-Zellen und anschließender Reinigung über Protein A wurde ein *Human Capture-ELISA* durchgeführt. Dazu wurden 100 μ L des Ziege-anti-Mensch polyvalent Antikörpers (100 ng/well) in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte für 1 h bei 37 °C immobilisiert und freie Bindungsstellen mit 200 μ L PBS-F (1 % FCS in PBS) für 1 h bei 37 °C abgesättigt. Nach dem Waschen wurde als Standard der *Human N Protein Standard SL* (Dade Behring, 9,91 mg/mL IgG) in verschiedenen Verdünnungen (in PBS-F) in Triplikaten in den Kavitäten inkubiert, zusätzlich wurden die zur Konzentrationsbestimmung vorgesehenen Proben in Verdünnungsstufen ebenfalls auf der gleichen MTP aufgetragen. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurden die MTPs gewaschen und der Nachweisantikörper Ziege-anti-Mensch IgG Fc spez., HRP-konj. (5 ng/well) für wiederum 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Entwicklung analog zum *Screening-ELISA*. Besonders wichtig war bei dieser Art der Konzentrationsbestimmung, dass bei der höchsten Konzentration des Standards eine sehr deutliche Blaufärbung sichtbar sein musste, bevor die Entwicklung gestoppt wurde. Aus den Werten der Standardreihe wurde eine Kalibriergerade erstellt und die Werte der Proben über die Geradengleichung bestimmt.

ELISA zur Bestimmung der Halbwertszeit des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4

Die Bestimmung der Halbwertszeit des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 geschah analog zu vorherigen Arbeiten [85–87]. Dazu wurden zunächst aus den Schwanzvenen dreier BALB/c-Mäuse Seren entnommen. Fünf Tage später wurden allen Mäusen intraperitoneal 100 μ g des scFv-Fc-Antikörpers injiziert. Nach 8 h, 1 d, 3 d, 5 d, 10 d, 15 d und 25 d wurden erneut Serumproben entnommen. Zur Bestimmung der Konzentration von scFv-Fc ToR67-3B4 wurde ein ELISA durchgeführt, in dem die Serumproben mit einer Standardreihe von scFv-Fc ToR67-3B4 verglichen wurden. Als Antigen dienten per Saccarose-

Dichtezentrifugation gereinigte und β -Propiolacton-inaktivierte TC83-Viruspartikel. Nach Bestimmung der Konzentrationen wurden Mittelwerte gebildet, die Werte logarithmiert und als Funktion der Zeit aufgetragen. Diese Werte wurden einer linearen Regression unterzogen und so die Geradengleichung $y = mx + b$ bestimmt. Darin ist m die Steigung der Regressionsgeraden. Um daraus die Halbwertszeit zu berechnen, wird folgende Formel benutzt:

$$T_{1/2} = \log_{10}(1/2)/m$$

2.4.2 SDS-PAGE

Für eine gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) durchgeführt. Hierbei wurde ein 12 %-iges Trenngel zwischen zwei Glasplatten (Bio-Rad, Mini-Protean-System) gegossen und auspolymerisiert. Anschließend erfolgte im zweiten Schritt das Gießen eines 4 %-igen Sammelgels und der Einsatz eines entsprechenden Probenkamms.

Tabelle 2.17: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamid-Gels – Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung eines 12 %-igen Trenngels und eines 4 %-igen Sammelgels für die SDS-PAGE

Komponente	Volumen (μL)	
	Trenngel	Sammelgel
dH ₂ O	1 300	1 000
30 % Acrylamid Mix	1 600	260
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1 000	-
1 M Tris-HCl pH 6,8	-	200
10 % SDS	40	15
10 % APS	40	15
TEMED	2	2
Gesamtvolumen	3 982	1 492

Zu analysierende Proben wurden mit 5xLämmli-Puffer [88] mit β -Mercaptoethanol versetzt und für 5–15 Minuten bei 95 °C denaturiert. Anschließend erfolgte die Beladung des Gels mit den Proben und einem Proteinmarker (molarer Massenstandard). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 15–30 mA und 300 V für 40–60 Minuten.

2.4.3 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Nach der SDS-PAGE wurde das Trenngel zur Coomassie-Färbung in 15–20 mL Coomassie-Färbelösung gelegt und in der Mikrowelle für ca. 1 Minute erhitzt und für 5 Minuten auf einer Wippe inkubiert. Nach dem Entfernen der Färbelösung wurden 15–20 mL Entfärbelösung hinzu gegeben und das Gel erneut für ca. 1 Minute erhitzt. Bei der folgenden Inkubation auf der Wippe wurde das Gel weiter entfärbt und der Coomassie-Farbstoff mit Papiertüchern aus der Entfärbelösung entfernt. Die Lagerung erfolgte in dH₂O.

2.4.4 Western-Blot

Mit dem Begriff Western-Blot wird das Übertragen von Proteinen auf eine Membran beschrieben, welches im *semi dry*-Verfahren durchgeführt wurde. Dazu wurden ein mit Laufpuffer getränktes Filterpapier auf eine Elektrodenplatte gelegt und eine mit Methanol aktivierte PVDF-Membran luftblasenfrei auf das Filterpapier übertragen. Ein PAA-Gel wurde nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine auf die Membran gelegt, ein weiteres getränktes Filterpapier wurde darauf platziert. Mit der zweiten Elektrodenplatte wurde das Gerät verschlossen und für 45 Minuten ein elektrisches Feld (20 V, 330 mA) angelegt. Durch das elektrische Feld wurden die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen.

2.4.5 Immunfärbung

Nach einem Western-Blot wurden die Proteine auf der Membran durch eine Immunfärbung nachgewiesen. Dazu wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für 30 Minuten in 2 % MPBS-T inkubiert und anschließend drei Mal mit PBS gewaschen. Für den Nachweis der produzierten scFv-Fc-Antikörper wurde ein Ziege-anti-Mensch-IgG Fc-spezifische AP-konjugierte Antikörper (1:25 000 in MPBS) verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1 h auf einer Wippe bei RT, anschließend wurde die Membran wiederum drei Mal mit PBS gewaschen, danach erfolgten zwei zusätzliche Waschschriffe mit Substratpuffer. Die Immunfärbung erfolgte durch die Inkubation in Substratlösung (NBT / BCIP, jeweils 1:100 in Substratpuffer) wodurch ein grauschwarzer Feststoff aus der Lösung gefällt wurde und auf der Membran die Proteine sichtbar machte. Nach ausreichender Färbung wurde die Membran gründlich mit dH₂O gespült, zwischen zwei Filterpapieren getrocknet und dokumentiert.

2.4.6 Affinitätschromatographie von scFv-Fc-Antikörpern

Die virusspezifischen scFv-Fc-Antikörper wurden in adhärenf wachsenden Zellen des Stammes HEK293T produziert und mittels Protein A-Affinitätschromatographie aus dem Kulturüberstand gereinigt. Dazu wurde das automatisierte Profinia-Reinigungssystem (Bio-Rad) mit einer 1 mL Protein A-Säule verwendet. Protein A ist ein aus *Staphylococcus aureus* stammendes Protein und interagiert mit dem Fc-Fragment von Immunglobulinen. Dadurch ist es auch zur Isolierung von scFv-Fc-Antikörpern gut geeignet. Zusätzlich zur Protein A-Säule wurden die Proben über eine 10 mL Entsalzungssäule gegeben.

Zur Reinigung der scFv-Fc-Antikörper wurde die Protein A-Säule äquibriert und anschließend mit dem Kulturüberstand beladen. Nach dem Waschen mit Laufpuffer wurden die gebundenen scFv-Fc-Antikörper mit einem sauren Elutionspuffer von der Matrix eluiert und auf die Entsalzungssäule geladen. Bei

diesem Schritt erfolgte die Zugabe eines PBS-Puffers, wodurch der saure Elutionspuffer neutralisiert wurde. Eine anschließende Dialyse war demnach nicht notwendig. Nach dem Beenden der Reinigung wurden die Säulen regeneriert und das System gereinigt. Alle Puffer wurden nach Herstellerangaben angesetzt und durch einen $0,45\ \mu\text{m}$ Filter filtriert und entgast. Die Konzentrationsbestimmung der Proben erfolgte direkt in der Profinia-Apparatur oder anschließend mittels *Human Capture*-ELISA oder NanoDrop ND 1.000.

2.4.7 Reinigung von Alphaviren

Die Produktion und Reinigung der Viren erfolgte am WIS der Bundeswehr in Munster. Zellkulturüberstände von infizierten Zellen wurden entweder durch eine Affinitätschromatographie (*Virus Recovery System*, VRS, Chisso America Inc., USA) oder eine Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Bei dem kommerziellen VRS-System wird ein Cellulose-bead-Medium mit geringen Konzentrationen von Sulfatestern eingesetzt, das ähnlich zu Kationenaustauschersystemen funktioniert. Dieses System hat eine hohe Bindespezifität für umhüllte Viren und bindet so selektiv je nach Ladung an vollständige Viren und Fragmente von Virushüllen. Zur Reinigung wurden 50 mL des Materials mit Adsorptionspuffer (0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,5) äquilibriert und mit bis zu 200 mL Viren enthaltendem Kulturüberstand beladen. Nach zwei Waschschritten mit 0,01 M Phosphatpuffer wurden die Viruspartikel mit 1 M NaCl eluiert. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte in zwei Schritten. Der erste Schritt war eine Ultrazentrifugation nach dem Prinzip der Zonenzentrifugation mit Saccharose (20 % Saccharose). Diese Methode zeichnet sich durch geringen mechanischen Stress aus und ermöglicht die Konzentrierung der morphologisch intakten Viruspartikel nach Zentrifugation bei $112\,000\ g$ für 2–3 h. Das Pellet wurde in 0,5–1 mL PBS resuspendiert und durch eine isopyknische Zentrifugation (20–60 % Saccharose) weiter gereinigt. Diese Zentrifugation wurde für 18 h bei $217\,500\ g$ durchgeführt, die Viruspartikel enthaltende Fraktion wurde anschließend isoliert und bei $-80\ ^\circ\text{C}$ gelagert.

2.4.8 Inaktivierung von Alphaviren

Die Inaktivierung der Alphaviren erfolgte am WIS der Bundeswehr in Munster. Dabei wurde jede Inaktivierung durch die Zugabe einer finalen Konzentration von 0,1 % β -Propionlacton (β -PL, Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Direkt vor der Anwendung wurde eine 10 %-ige β -PL Lösung hergestellt, 100 μ L zu 5 mL Viren enthaltendem Kulturüberstand gegeben (pH 8–8,5) und 1 h bei 4 °C und 4 h bei 37 °C unter konstantem Rühren inkubiert. Nach 2–4 Stunden wurde der pH-Wert des Kulturüberstandes gemessen und korrigiert, falls nötig. Zur Sicherstellung der vollständigen Hydrolyse des verbleibenden β -PLs wurde der Überstand für weitere 12–18 h bei 4 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 30 Minuten bei 1 000 *g* wurden die inaktivierten Viruspartikel zu Vero-Zellen gegeben und die Zellen für 3–5 Tage auf cytopathische Effekte untersucht.

2.4.9 Biotinylierung von Antikörpern

Die Biotinylierung von scFv-Fc-Antikörpern und mAKs wurde am WIS der Bundeswehr in Munster durchgeführt. Dazu wurden 1–2 mg mAKs oder scFv-Fc-Antikörper in Natriumbicarbonat-Puffer (pH 8,5) aufgenommen und mit einer Menge Biotin-N-Hydroxysuccinimidester (langer Arm, wasserlöslich, Vector Laboratories, USA), versetzt, die 1/10 des Gewichts des zu koppelnden Proteins entsprach. Nach einer Inkubation für 2 h bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mg Glycin gestoppt und verbliebenes Biotin durch eine Gelfiltration mittels PD-10 Entsalzungssäulen mit Sephadex G25 (GE Healthcare, USA) nach Herstellerangaben entfernt.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Transfektion HEK293T-Zellen

Die Produktion von scFv-Fc-Antikörpern erfolgte an der TU BS in HEK293T-Zellen. Diese wurden mit dem Vektor pCMX2.5-hIgG1-Fc-XP, in den zuvor

die genetische Information der anti-VEEV- bzw. anti-WEEV-scFvs integriert wurde, transfiziert. Das kationische Transfektionsreagenz PEI (Polyethylenimin) wurde dabei mit der Vektor-DNA inkubiert und der PEI-DNA-Komplex nach kurzer Inkubation in das Medium von adhärent wachsenden HEK293T-Zellen gegeben. Dazu wurden zuvor 10 μg DNA und 40 μL PEI (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in je 250 μL gelöst und vereinigt. Nach 15–30 Minuten Inkubation bei RT wurde das Gemisch auf die mit Medium überschichteten HEK293T-Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt

2.5.2 Produktion von scFv-Fc-Fusionsproteinen

Zur Vorbereitung der Produktion wurden 10 cm-Petrischalen mit Poly-L-Lysin beschichtet, um eine gute Adhäsion der Zellen an der Plastikoberfläche zu erreichen. Am Tag vor der Transfektion wurden in diese Platten HEK293T-Zellen eingebracht. Die Menge der Zellen wurde so gewählt, dass am Tag der Transfektion etwa 50–70 % der Schalenoberfläche bewachsen war. Nach der Transfektion erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C und 7 % CO₂-Begasung in DMEM-Medium mit 8 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung. Am folgenden Tag wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches DMEM-Medium mit 4 % FCS (IgG *stripped*) und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung auf die Zellen gegeben. Der erste Überstand wurde verworfen, da darin Rückstände von PEI und DNA vorhanden sein konnten. Außerdem konnten in dem genutzten Medium nicht unerhebliche Mengen boviner IgGs vorhanden sein, die bei einer folgenden Reinigung ebenfalls angereichert werden konnten. Daher wurde ab diesem Medienwechsel IgG-abgereichertes FCS verwendet.

Das Medium wurde täglich für bis zu 14 Tage gewechselt, das geerntete Medium mit den enthaltenen scFv-Fc-Antikörpern wurde bis zur Reinigung bei 4 °C gelagert.

2.5.3 Produktion von VEE- und WEE-Viruspartikeln

Alle in dieser Arbeit genutzten Viren sind entweder Teile der Stammsammlung des WIS der Bundeswehr in Munster oder des *dstl Defense Science & Technology Laboratory* in Porton Down, England. Die Stämme der Subtypen IA/B (*Trinidad Donkey*, TrD), IC (P676), ID (3880), IE (Mena II), IF (78V), II (Fe37c), IIIA (BeAn8), IV (PIXV), V (CaAr508) und VI (AG80) wurden durch Dr. R. E. Shope (Universität von Texas, Medical Branch, USA) zur Verfügung gestellt. Das Östliche Pferdeenzephalitis-Virus (EEEV, Stamm H178/99) und Westliche Pferdeenzephalitis-Virus (WEEV, Stamm H160/99) wurden von der *National Collection of Pathogenic Viruses* (NCPV), England, zur Verfügung gestellt.

Die Alphaviren wurden in BHK- (*Baby Hamster Kidney*), Vero-B4- (Nierenzellen von Grünen Meerkatzen) oder L929- (Maus-Fibroblasten) Zellen bei 37 °C und 4 % CO₂-Begasung in einem S3-Labor unter Standardbedingungen kultiviert [85, 89–91]. Diese Zelllinien wurden vom DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Braunschweig oder der *European Collection of Animal Cell Cultures*, Porton Down, England bezogen. Die Virus enthaltenden Überstände der infizierten Zellen wurden geerntet, sobald 50–75 % der Zellen virale cytopathische Effekte aufwiesen. Die Virustiter wurden über den TCID₅₀/mL (*Tissue Culture Infective Dose*) bestimmt und lagen durchschnittlich bei $1 \cdot 10^7$ bis $1,5 \cdot 10^{10}$ TCID₅₀/mL [92–94].

2.5.4 Generierung von stabil exprimierenden Mammalia-Zellen

Die VEEV- und WEEV-spezifischen scFvs wurden aus dem Phagemidvektor pHAL14 über die Schnittstellen NcoI und NotI in den Mammalia-Expressionsvektor pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP kloniert und am WIS in Munster zur Herstellung stabil exprimierender Zellen genutzt. Um stabil exprimierende Zellen zu generieren, wurden CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*)-Zellen mittels 80 µL Polyfect (Qiagen GmbH, Hilden) und 4–5 µg Plasmid DNA transfiziert. Stabil

exprimierende Klone wurden über eine Resistenz gegenüber Geniticin (G418) selektiert. Dazu wurden CHO-Zellen über Nacht in einer 1 000 mm² Petrischale bis zu einer Konfluenz von 60–80 % in DMEM/HAM's F-12-Medium mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % (w/v) Penicillin und 1 % (w/v) Streptomycin ohne Selektionsmarker bei 37 °C und 4 % CO₂-Begasung kultiviert. Zur Bildung eines DNA-Lipid-Komplexes wurden die Plasmid-DNA und das Polyfect-Reagenz in Medium ohne Zusätze für 10 Minuten bei RT inkubiert. Gleichzeitig wurden die CHO-Zellen mit PBS gewaschen. Zum DNA-Lipid-Komplex wurden 7 mL Medium mit FCS und Penicillin/Streptomycin gegeben und anschließend komplett auf die Zellen gegeben. Nach 3 h Inkubation wurden die Zellen erneut gewaschen und frisches DMEM/HAM's F-12 mit 10 % (v/v) FCS and 1 % (w/v) Penicillin/Streptomycin auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation bei 37 °C und 4 % CO₂-Begasung über Nacht folgte ein erneuter Medienwechsel. Die transfizierten Zellen wurden mit Trypsin von der Petrischale abgelöst und in einer 1:20- und 1:50-Verdünnung auf neuen Petrischalen transferiert, die mit Selektivmedium mit 700 mg/mL G418 überschichtet wurden. Im Abstand von 3–4 Tagen wurde das Medium gewechselt und stabile G418-resistente Klone konnten nach etwa drei Wochen beobachtet werden. In der vierten und fünften Woche nach Transfektion wurden Einzelklone isoliert und in 24-well-Platten weiter kultiviert. Da die Produktion in den einzelnen Klonen variieren kann, wurden die Überstände von je 48 Einzelklonen auf vorhandene VEEV- bzw. WEEV-spezifische scFv-Fc-Antikörper untersucht. Schließlich wurden drei Klone ausgewählt und in einer Suspensionskultur im miniPerm Bioreaktor kultiviert, in denen zwei Mal wöchentlich das Medium (DMEM/HAM's F-12. 10 % (v/v) (FCS), 1 % (w/v) Penicillin/Streptomycin, 700 mg/mL G418) geerntet und durch frisches Medium ersetzt wurde. Die Reinigung erfolgte durch Immunaффinitätschromatographie mit GAH Sepharose (*Goat anti Human*).

2.5.5 Neutralisationstests

NPLA-Assay

Der NPLA Assay (*Neutralising peroxidase-linked antibody*) wurde im WIS der Bundeswehr in Munster nach der Technik von Jensen [95] mit diversen Modifikationen durchgeführt. Alle Experimente wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt, Vero-B4 Zellen dienten als Wirt für die Infektion. Jeweils 50 μL der scFv-Fc-Antikörper oder mAKs in 1:2-Verdünnungsstufen (Anfangskonzentrationen zwischen 0,5 und 1,0 mg/mL) wurden mit dem gleichen Volumen der VEE-Virusstämme TC-83, TrD und Fe37c mit einer $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ von $5 \cdot 10^4$ für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 μL frisch abgelöster Vero-Zellen mit einer Konzentration von $4 \cdot 10^5$ Zellen/mL zu der Antikörper-Virus-Mischung gegeben. Als Kontrollen wurden Viren eingesetzt, die ohne Antikörper inkubiert wurden, sowie auch Viren, die mit dem VEEV-spezifischen Antikörper WIS VEE1 inkubiert wurden, welcher keine neutralisierenden Eigenschaften zeigt. Außerdem wurden Viren eingesetzt, die mit dem mAK SFV 8/6 bzw. dem mAK 1A3B-7 inkubiert wurden, welche beide neutralisierende Eigenschaften aufweisen [42, 96]. Nicht infizierte Vero-Zellen dienten als Negativkontrolle. Nach 20–24 h wurden die Zellen mit 3 % Formalin für 3 h bei 4 °C fixiert und anschließend die Infektion der Zellen durch eine spezifische Immunfärbung der viralen Antigene gezeigt. Nach dem Waschen mit PBS-T wurden die Zellen mit 100 μL einer 1:5 000 Verdünnung des VEEV-spezifischen biotinylierten mAK SFV 8/6 überschichtet und für 2 h bei RT inkubiert. Gebundene biotinylierte Antikörper wurden mit einem Streptavidin-HRP Konjugat (1:6 000, GE Healthcare, USA) detektiert und die Färbung erfolgte durch Zugabe von TMB-Substrat. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 μL 1 M H_2SO_4 gestoppt und die Absorption bei $\lambda=450\text{ nm}$ bestimmt. Die Absorptionen wurden mit relativer Infektiösität korreliert, indem die Absorption bei der Positivkontrolle mit VEEV-infizierten Vero-Zellen ohne Antikörper auf 100 % gesetzt wurde. Eine Reduktion auf 50 % oder weniger bei den Absorptionswerten wurde als Indikator für neutralisierende Aktivität definiert.

Plaque Reduction Assay

Die Fähigkeit des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4, die Infektionsfähigkeit von VEE-Virusstämmen zu neutralisieren, wurde am dstl in Porton Down, England mit dem *Plaque Reduction Assay* untersucht. Dazu wurden 25 μg des scFv-Fc-Antikörpers mit den VEEV Stämmen TrD, Fe37c und BeAn8 (jeweils etwa 100 pfu (*plaque forming units*)) versetzt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die verbleibende Infektiösität wurde durch ein Standard-Plaque Experiment bestimmt, wie schon zuvor beschrieben wurde [91].

2.5.6 Immunhistochemische Färbung von Vero-Zellen

In 96 well Mikrotiterplatten wurden je 100 μL einer Zellsuspension mit $2 \cdot 10^5$ Zellen/mL für 24 h inkubiert und mit den Proben einer Verdünnungsreihe der Viren VEEV TC-83 und TrD infiziert. Nicht infizierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Eine spezifische Detektion von VEEV-infizierten Zellen wurde durch den biotinylierten scFv-Fc-Antikörper ToR67-4B4 und mit dem biotinylierten mAK SFV 8/6, welcher als Positivkontrolle diente [97], durchgeführt. Dazu wurden die Zellen einen Tag nach der Infektion 3 h bei 4 °C mit 3 % Formalin in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit den Antikörpern in 1:5 000 bzw. 1:10 000 Verdünnungen in PBSF-T für 1 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T wurden die Zellen für 30 Minuten mit einem Streptavidin-HRP-Konjugat (1:6 000 in PBSF-T) inkubiert. Nach weiteren Waschschritten wurden die Zellen für 10 Minuten mit TMB-Substratlösung inkubiert, danach wurde die Farbreaktion durch Waschen mit dH₂O gestoppt.

2.6 Tierversuche

2.6.1 Passive Immunisierung von Mäusen

Am dstl, Porton Down, England wurden sechs bis acht Wochen alte BALB/c-Mäuse für alle Untersuchungen zur passiven Immunisierung genutzt. Die Nutzung der Tiere für Tierversuche entsprach den geltenden englischen Richtlinien. Die Mäuse wurden durch ein Aerosol mit verschiedenen VEEV Stämmen infiziert, wobei ein *Three Jet Collision Nebulizer* [98] innerhalb eines Henderson Apparats [99] genutzt wurde. Die Mäuse wurden 6 h nach der Infektion mit 100 μ g des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4, einem unspezifischen humanen IgG Antikörper, einem anti-WEEV scFv-Fc-Antikörper behandelt, oder blieben komplett unbehandelt. Die Mäuse wurden zweimal täglich auf Anzeichen einer Erkrankung (Aufrichten der Körperhaare, zusammengekauerte Körperhaltung, Inaktivität, Erregbarkeit und Paralyse) durch einen Mitarbeiter untersucht, welcher keine Kenntnis von der Behandlung hatte. Die Tiere wurden bei ernsthaften Anzeichen einer Erkrankung getötet [100].

2.6.2 Immunisierung von Makaken

Die Immunisierung der männlichen Makaken mit inaktivierten Viruspartikeln zur Herstellung einer Immunantikörpergenbibliothek erfolgte durch P. Thullier am *Centre de Recherche du Service de Santé des Armées* in La Tronche, Frankreich. Die Immunisierung und die Entnahme des Knochenmarks erfolgte unter den in Frankreich gültigen ethischen Grundsätzen, Richtlinien und Standards für Tierversuche: “*Partie réglementaire du livre II du code rural (Titre I, chapitre IV, section 5, sous section 3:expérimentation sur l’animal)*”, “*Décret 87-848 du 19-10/1987 relatif aux expériences pratiquées sur les animaux vertébrés, modifié par le décret 2001/464 du 29/05/2001*”, “*Arrêté du 29 octobre 1990 relatif aux conditions de l’expérimentation animale pour le ministère de la défense*” and “*Instruction 844/DEF/DCSSA/AST/VET du 9 avril 1991 relative aux conditions de réalisation de l’expérimentation animale*”.

3

Ergebnisse

3.1 Generierung von drei scFv-Antikörpergenbibliotheken

Zur Herstellung der scFv-Antikörpergenbibliotheken wurden zwei Makaken mit β -Propiolacton inaktivierten VEEV bzw. WEEV mehrfach immunisiert. Mittels ELISA wurde das Serum auf enthaltene VEEV bzw. WEEV spezifische Antikörper getestet. Dazu wurden Viren in Mikrotiterplatten immobilisiert, mit den Seren der Makaken inkubiert und gebundene VEEV und WEEV spezifische Antikörper nachgewiesen (Abbildung 3.1).

Mit diesem ELISA konnte gezeigt werden, dass durch jede zusätzliche Impfung mit VEEV TC83 eine Erhöhung des spezifischen Antikörpertiters erreicht wurde. Die spezifisch bindenden Antikörper konnten bis zur maximalen Verdünnung von 1:10 240 nachgewiesen werden, die Kontrolle mit dem Präimmunserum (PI) zeigte nur in sehr hohen Konzentrationen eine geringe unspezifische Bindung. Auch eine zusätzliche Kontrolle ohne Viren bestätigte, dass die in den Immunseren vorhandenen Antikörper nur spezifisch an VEEV banden (Daten siehe Anhang, S. 130). Bei den mit WEEV immunisierten Makaken wurden ähnliche Ergebnisse erreicht, es wurde eine spezifische Bindung an WEE-Viruspartikel nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

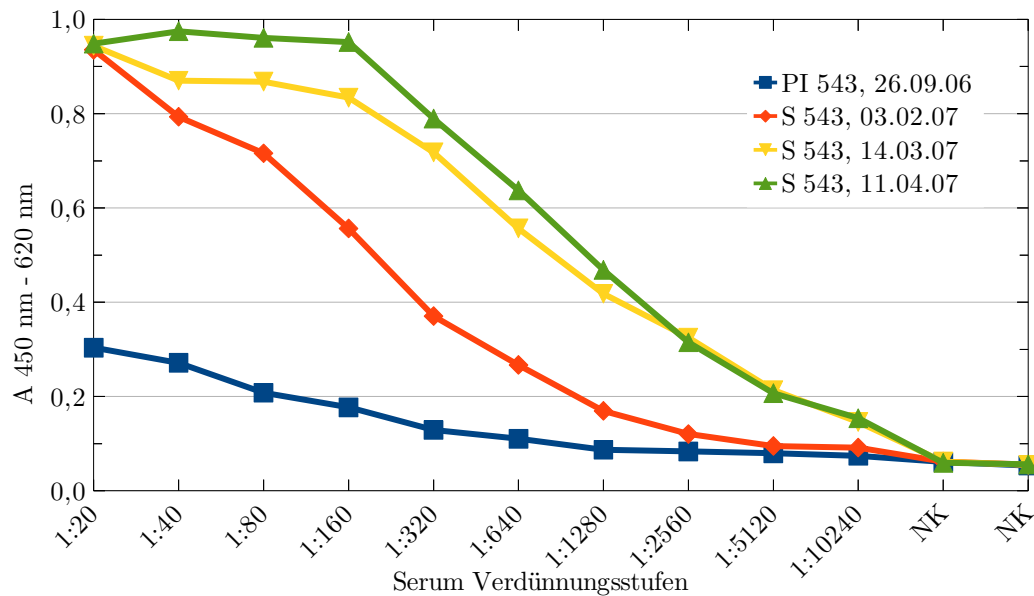


Abbildung 3.1: ELISA mit den Makaken-Seren auf VEE-Viren – Zur Bestimmung des spezifischen Antikörpertiters gegen VEEV TC83 wurden VEEV TC83-Viruspartikel in Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach Inaktivierung bei 56 °C wurden Präimmunserum (PI 543) bzw. an verschiedenen Tagen des Immunisierungsexperiments geerntete Immunsereen (S 543) auf den Viruspartikeln inkubiert. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit dem polyklonalen Antikörpergemisch Kaninchen-anti-Affe-HRP (Sigma-Aldrich) detektiert. Die Färbung erfolgte mit 3-3', 5-5'-Tetramethylbenzidin (TMB, Serva). Exemplarisch für alle drei Immunisierungen ist hier das Ergebnis für VEEV dargestellt (Daten: WIS).

Bei dem mit VEEV immunisierten Makaken erfolgte nach der Entnahme von Knochenmark eine weitere Immunisierung mit WEEV, um die Bildung von Antikörpern, die beide Virusstämme binden sollten, d.h. eine breitere Spezifität aufweisen sollten, zu erreichen. Aus den Knochenmarkszellen der immunisierten Tiere wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Aus der cDNA wurden die für V_H und V_L codierenden Antikörpersequenzen mittels PCR amplifiziert und getrennt voneinander in einen pGEM-T-Vektor kloniert (Tabelle 3.1, S. 57, Durchführung von P. Thullier, *Centre de Recherche du Service de Santé des Armées*, La Tronche, Frankreich).

Tabelle 3.1: Subbibliotheken – Tabelle zu den Diversitäten der V_H - bzw. V_L -Subbibliotheken nach der ersten Amplifikation und Klonierung in den pGEM-T Vektor

Subbibliothek	Individuelle Klone	
	V_H	V_L
VEEV	$2,6 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$
WEEV	$5,0 \cdot 10^4$	$9,0 \cdot 10^4$
WEEV nach VEEV	$4,4 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^5$

Mittels PCR-Amplifikation der V_H - und V_L -Genfragmente mit spezifischen Primerpaaren wurden zusätzliche Schnittstellen an den Enden angefügt. Die beiden V-Genfragmente wurden in zwei Schritten in den Vektor pHAL14 (Abbildung 3.2) kloniert.

Die Klonierung der V_L erfolgte zuerst, gefolgt von der Klonierung der V_H -Sequenz. Die Diversität von Antikörpern wird maßgeblich durch die in ihrer Länge sehr variable HCDR3 bestimmt [25, 101]. Somit trägt V_H mehr zur Variabilität von Antikörpern bei. Um diese Diversität zu erhalten, wurde erst die V_L Genfragmente kloniert und nachträglich die V_H Genfragmente [79].

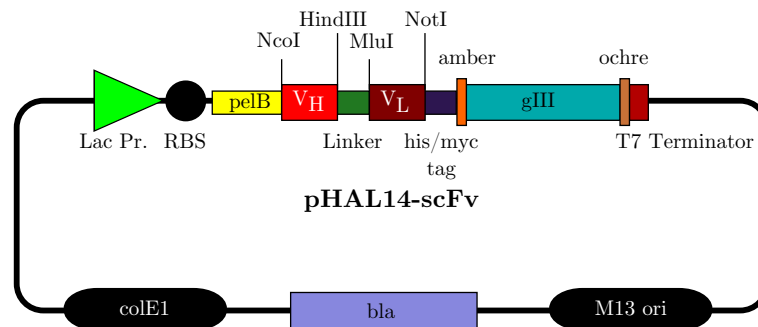


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des pHAL14 Phagemids – Zur Klonierung der V_L Fragmente wurden V_L Gensequenzen und Phagemid mit den Restriktionsendonukleasen MluI und NotI geschnitten und anschließend ligiert. Im zweiten Schritt wurden die V_H Genfragmente über die Restriktionsschnittstellen NcoI und HindIII in das Phagemid kloniert (Abbildung nach M.Hust).

Mit dieser Klonierungsstrategie wurden die Antikörpergenbibliotheken VEEV (ToR63), WEEV (ToR62) und WEEV nach VEEV (ToR64) generiert. Die maximalen Diversitäten der Immunbibliotheken sind in Tabelle 3.2 auf S. 58 dargestellt und liegen zwischen $1,3$ und $2,4 \cdot 10^7$ individuellen Klonen.

Tabelle 3.2: Diversität der Immunbibliotheken – Anzahl der individuellen Klone der generierten Immunbibliotheken

Antikörpergenbibliothek	Individuelle Klone
VEEV (ToR63)	$1,6 \cdot 10^7$
WEEV (ToR62)	$1,3 \cdot 10^7$
WEEV nach VEEV (ToR64)	$2,4 \cdot 10^7$

Durch Kolonie-PCRs wurde die Qualität der Bibliotheken überprüft. Alle drei Immunbibliotheken enthielten mehr als 90 % vollständige scFv-Antikörperfragmente. Für die erste Selektion wurden die Immunbibliotheken mit dem Helferphagen Hyperphage verpackt.

3.2 Antikörperselektion auf aktiven Viruspartikeln

Die Durchführung der Antikörperselektion (*Panning*) erfolgte im WIS in Munster. Dabei wurden drei unterschiedliche *Pannings* durchgeführt. Die Selektion von Bindern gegen VEEV wurde auf mittels monoklonalem Antikörper (mAK VEE WIS1) immobilisierten VEE-Viren des attenuierten Impfstamms TC83 durchgeführt. Für die Isolation von anti-WEEV-Bindern wurden die WEEV- und WEEV nach VEEV-Antikörpergenbibliotheken eingesetzt und ebenfalls auf mittels monoklonalem Antikörper immobilisierten aktiven WEE-Viren selektiert.

3.3 Screening monoklonaler Antikörper

Um monoklonale Binder zu identifizieren, wurde nach 2 bis 3 *Panning*-Runden 322 Einzelklone aus dem VEEV-*Panning* isoliert und in Mikrotiterplatten lösliche scFvs produziert. Die Spezifität wurde mittels ELISA untersucht (Abbildung 3.3).

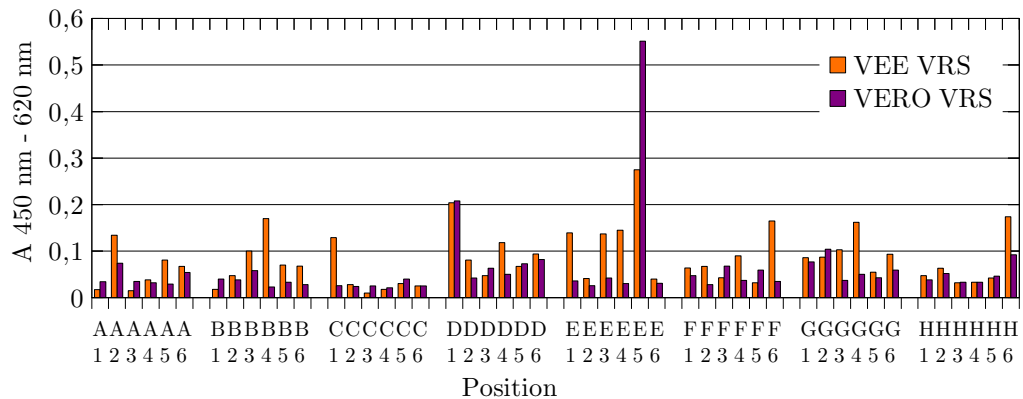


Abbildung 3.3: Monoklonaler ELISA mit isolierten scFvs aus dem *Panning* gegen VEEV – Für den monoklonalen ELISA mit den isolierten scFvs aus der Antikörpergenbibliothek VEEV (ToR63) wurden in jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte 300 ng des mAK VEE WIS1 immobilisiert und folgend aktive VEE-Viren inkubiert. Nach der Produktion von scFvs der Einzelklone wurden 50 μ L des Kulturüberstands mit 50 μ L Block-Puffer gemischt und im monoklonalen ELISA getestet. Der Nachweis der gebundenen scFvs erfolgte über einen Maus-anti-c-myc-IgG 9E10 Antikörper und ein Ziege-anti-Maus-IgG (Fc spez.) HRP-Konjugat. Substrat: TMB. (Beispiel für 46 der 322 untersuchten Klone. Für weitere Daten siehe Anhang, S. 131 ff.)

Im monoklonalen ELISA banden insgesamt 24 scFv-Klone spezifisch an immobilisierte VEE-Viruspartikel. Die Sequenzierung dieser Klone ergab, dass alle untersuchten Klone sequenzidentisch waren. Der Klon ToR67-3B4 wurde aufgrund der höchsten Absorptionswerte für alle weiteren Experimente ausgewählt. Analog zu den beschriebenen Tests zur Identifikation von VEEV-spezifischen scFvs wurden auch die Klone für WEEV untersucht. Für die monoklonalen ELISAs mit den scFv-Klonen aus dem WEEV-*Panning* wurden insgesamt 96 Einzelklone genutzt, von denen sechs eine spezifische Bindung an WEE-Viren zeigten. Die Sequenzierung ergab, dass es sich um sechs individuelle Klone handelte, von denen zwei Klone im weiteren Verlauf eine sehr

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Antikörperselektion – Die Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Antikörperselektion.

Im <i>Panning</i> benutzte Antikörpergenbibliothek	Anzahl der untersuchten scFv-Klone	Anzahl der spezifischen Klone ¹	Anzahl der individuellen Binder ²
VEEV (ToR67)	322	24	1
WEEV (ToR68)	96	4	4
WEEV nach VEEV (ToR69)	48	42	2

¹ mittels ELISA identifiziert, ² mittels Sequenzierung validiert

schwache sowie eine stark unspezifische Bindung aufwiesen und nicht weiter charakterisiert wurden.

Im monoklonalen ELISA mit 48 Klonen aus Runde 3 des WEEV nach VEEV-*Pannings* wurde für 42 Klone eine spezifische Bindung an WEEV nachgewiesen. Acht dieser Klone wurden aufgrund der höchsten Absorptionswerte ausgewählt und sequenziert, dabei wurden zwei individuelle Klone identifiziert.

3.4 Bioinformatische Analysen

Zur bioinformatischen Analyse wurde die Datenbank VBASE2 [70, 102] genutzt. Durch diese Datenbank erfolgte ein Vergleich der V_H und V_L Antikörpergensequenzen aus den Makaken-Immunbibliotheken mit den Sequenzen von humanen und murinen Keimbahnlinien. Es wurden sowohl CDR- und Framework-Region, sowie auch die Ig-Keimbahnlinien aller Antikörperklone bestimmt.

Für die weitere bioinformatische Analyse wurde der *Germinality Index* der isolierten scFvs bestimmt. Insbesondere für therapeutische Anwendungen rekombinanter Antikörper im Menschen sollten diese eine möglichst hohe Homologie zu humanen Antikörpergenen besitzen. Dabei beruht der *Germinality Index* auf einem Aminosäuresequenzvergleich mit der entsprechenden, am nächsten verwandten, humanen Sequenz der vier *Framework*-Bereiche. Der *Germinality*

Tabelle 3.4: Bioinformatische Analyse mittels VBASE2 und *Germinality Index* – Die Werte zeigen die bioinformatische Auswertung des Vergleichs der scFvs mit den humanen Immunglobulin-Keimbahnlinien. Die mathematische Grundlage des *Germinality Index* ist die prozentuale Abweichung von der *Framework*-Region der humanen Vergleichssequenz.

Klonname	Keimbahnlinie					<i>Germinality Index</i> in %	
	V V _H	D V _H	J V _H	V V _L	J V _L	V _L	V _H
ToR67-3B4	IGHV4-59*01	IGHD5-12*01	IGHJ4*02	IGKV2-30*01	IGKJ1*01	87	82
ToR68-2C3	IGHV1-2*02	IGHD3-3*01inv	IGHJ5*02	humIGKV085	IGKJ1*01	91	85
ToR68-2E9	IGHV3	IGHD1-7*01	IGHJ5*02	IGKV1-17*01	IGKJ2*01	89	88
ToR68-3A4	IGHV4-61*08	IGHD3-10*01	IGHJ4*02	IGKV1-39*01	IGKJ1*01	n. d.	n. d.
ToR68-3G2	IGHV4-4*07	IGHD2-21*02	IGHJ4*02	IGKV3D-15*01	IGKJ1*01	n. d.	n. d.
ToR69-3A2	IGHV3-72*01	IGHD3-22*01	IGHJ5*02	IGKV1D-13*01	IGKJ1*01	90	90
ToR69-3C4	IGHV3-23*01	IGHD2-15*01	IGHJ3*02	IGKV1-12*01	IGKJ1*01	92	84

n. d.: Wert nicht bestimmt

Index liegt für die leichten Ketten aller isolierten scFvs zwischen 87 % und 92 %, für die schweren Ketten zwischen 82 % und 90 % (Tabelle 3.4).

3.5 Produktion von scFv-Fc-Antikörpern

Für die Produktion und nachfolgenden Tests wurden die scFv-Antikörperfragmente in das bivalente scFv-Fc Format überführt. Dazu wurde der Vektor pCMX2.5-hIgG1-Fc-XP gewählt, um die scFvs mit dem Fc-Fragment des humanen IgG1 zu fusionieren. Mit der Klonierung in diesen Vektor können im Mammalia-Produktionssystem scFv-Fc-Antikörper hergestellt werden, die IgG-ähnliche Eigenschaften besitzen. Die Produktion der scFv-Fc-Antikörper wurde an der TU Braunschweig mit Hilfe von transient transfizierten Zellen und teilweise am WIS mit stabil transfizierten Zelllinien durchgeführt.

Mit Plasmiden aller Klone wurden adhärent wachsende HEK293T-Zellen transient transfiziert und der Zellkulturüberstand täglich für bis zu 14 Tage geerntet. Die scFv-Fc Fusionsproteine wurden im Folgenden über eine Protein A-Affinitätschromatographie gereinigt und die Konzentrationen densitometrisch oder per ELISA bestimmt.

Tabelle 3.5: Konzentrationsbestimmung mittels *Human Antibody Capture ELISA* – Mittels *Human Antibody Capture ELISA* ermittelte Konzentrationen der scFv-Fc-Antikörper nach der Reinigung über Protein A.

scFv-Fc Antikörper	Konzentration ($\mu\text{g/mL}$)
ToR67-3B4	49,2
ToR68-2C3	10,4
ToR68-2E9	111,2
ToR68-3A4	14,3
ToR68-3G2	185,4
ToR69-3A2	20,0
ToR69-3C4	145,5

Zur Bestimmung der Konzentrationen nach der Reinigung wurde ein *Human Antibody Capture ELISA* durchgeführt. Dabei werden unterschiedliche Verdünnungsstufen der produzierten scFv-Fc-Antikörper mittels monoklonalem Fängerantikörper gebunden und im Anschluß mit einem monoklonalen HRP-konjugierten anti-Mensch-Antikörper nachgewiesen. Die Absorptionswerte wurden mit einer Standardreihe verglichen, die mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen eines Protein-Standards erstellt wurde. Die erhaltenen Werte für die Konzentrationsbestimmung sind in Tabelle 3.5 dargestellt und lagen zwischen 10,4 und 185,4 $\mu\text{g/mL}$.

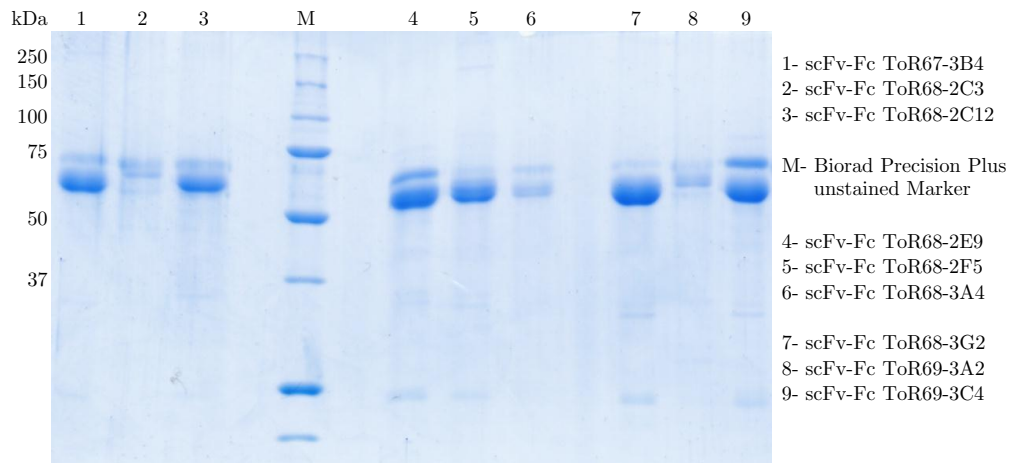


Abbildung 3.4: Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE – Nach Reinigung mittels Protein A-Affinitätschromatographie wurden 10 μ L der scFv-Fc-Antikörper mit Lämmli-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 98 °C denaturiert. Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen und die SDS PAGE wurde mit einem 12 % Polyacrylamid Gel für etwa 45 min bei 30 mA durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie-Färbelösung angefärbt. Dieses Bild zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Produktion der scFv-Fc-Antikörper, die an der TU Braunschweig durchgeführt wurde.

Zur Kontrolle der Reinheit wurde mit den gereinigten scFv-Fc-Antikörpern eine SDS-PAGE durchgeführt. Ein PAA-Gel wurde zur Färbung mit Coomassie-Lösung genutzt (Abbildung 3.4). Die Färbung zeigt, dass die Proteine in einer ausreichenden Reinheit vorhanden waren. Die Größe der angefärbten Proteine lag zwischen 60 kDa und 70 kDa und entspricht somit der Größe von scFv-Fc-Antikörpern.

Mit einem weiteren PAA-Gel wurde ein Western-Blot mit anschließender Immunfärbung durchgeführt. In diesem Experiment findet nur eine spezifische Färbung der scFv-Fc-Antikörper statt, so dass gezeigt werden konnte, dass es sich bei den isolierten Proteinen um scFv-Fc-Antikörper handelte (Abbildung 3.5).

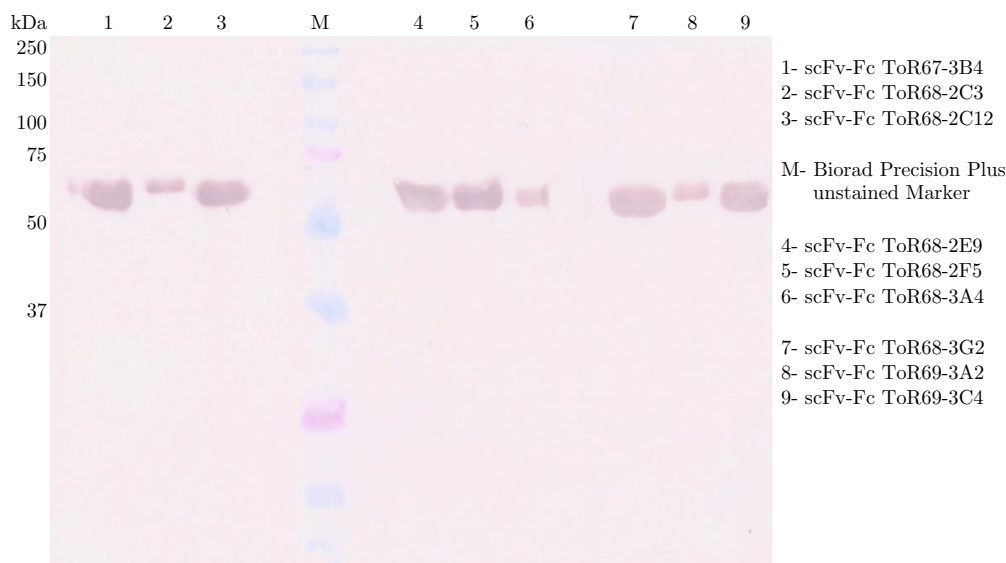


Abbildung 3.5: Western Blot und Immunfärbung nach SDS-PAGE – Nach Reinigung mittels Protein A-Affinitätschromatographie wurden 10 μ L der scFv-Fc-Antikörper mit Lämmli-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 98 °C denaturiert. Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen und die SDS PAGE wurde mit einem 12 % Polyacrylamid Gel für etwa 45 min bei 30 mA durchgeführt. Danach wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen (45 min, 770 mA, 20 V) und eine Immunfärbung durchgeführt. Dazu wurden die scFv-Fc-Antikörper mit einem Ziege-anti-Mensch IgG, Fc spezifisch, AP Konjugat-Antikörper inkubiert, die Färbung erfolgte mit NBT/BCIP. Diese Bild zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Produktion der scFv-Fc-Antikörper, die an der TU Braunschweig durchgeführt wurde.

Am WIS wurden stabil exprimierende CHO-K1 Zellen mit den Plasmiden der scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4, ToR68-3A4, ToR68-3G2 und ToR69-3A2 hergestellt und in einem Minireaktor kontinuierlich produziert. Diese scFv-Fc-Antikörper wurden über eine Affinitätschromatographie mittels anti-Mensch-Antikörpern gereinigt und auf Konzentrationen von ca. 1 mg/mL eingestellt (Daten nicht gezeigt).

3.6 Charakterisierung des VEEV spezifischen scFv-Fc ToR67-3B4 mittels ELISA

Zur Charakterisierung des VEEV spezifischen scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 wurde ein Titrations-ELISA durchgeführt. Dabei wurden 3 Verdünnungen des

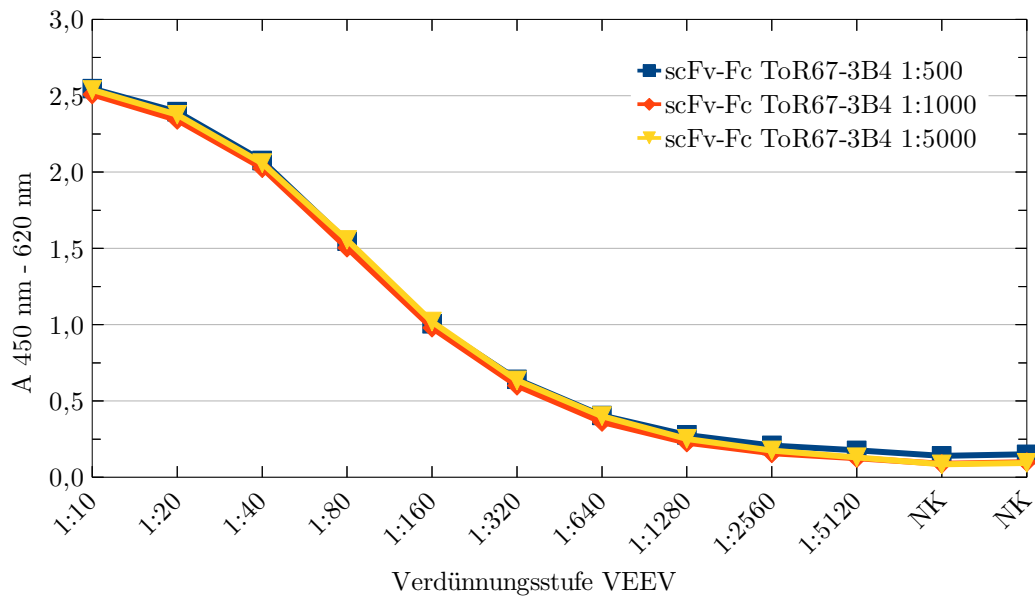


Abbildung 3.6: Titrations-ELISA mit dem biotinylierten scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 – Zur Bestimmung der einzusetzenden Konzentrationen von Viren und scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 wurden 300 ng des VEEV spezifische monoklonale Antikörpers mAK WIS VEE1 in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit unterschiedliche Viruskonzentrationen enthaltenden Zellkulturüberständen inkubiert. Die Detektion der Viren erfolgte mit dem biotinylierten scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 in drei Verdünnungen (Ausgangskonzentration: 1 mg/mL, produziert am WIS). Der Nachweis erfolgte über ein Streptavidin-HRP-Konjugat. (Daten: WIS)

biotinylierten scFc-Fc Antikörpers getestet und die eingesetzte Virusmenge variiert. Das Ergebnis der Titration ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

Die absoluten Menge an eingesetztem scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 betrugen zwischen 200 ng (1:500 Verdünnung) und 20 ng (1:5 000 Verdünnung). Die bestimmten Absorptionswerte waren trotz unterschiedlicher Antikörperkonzentrationen identisch. Somit kann mit einer absoluten Menge von 20 – 100 ng des scFv-Fc-Antikörpers im ELISA ein maximales Signal erhalten werden. Die Titration der VEE-Viren ergab, dass zwischen den Verdünnungsstufen 1:80 und 1:160 der genutzten Viren enthaltenden Zellkulturüberstände eine halbmaximale Bindung erreicht werden kann.

Zur Bestimmung der genauen Spezifität des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 wurden Sandwich-ELISAs mit unterschiedlichen Alphavirusstämmen durchgeführt. Dabei wurde scFv-Fc ToR67-3B4 als Nachweisantikörper und als Fän-

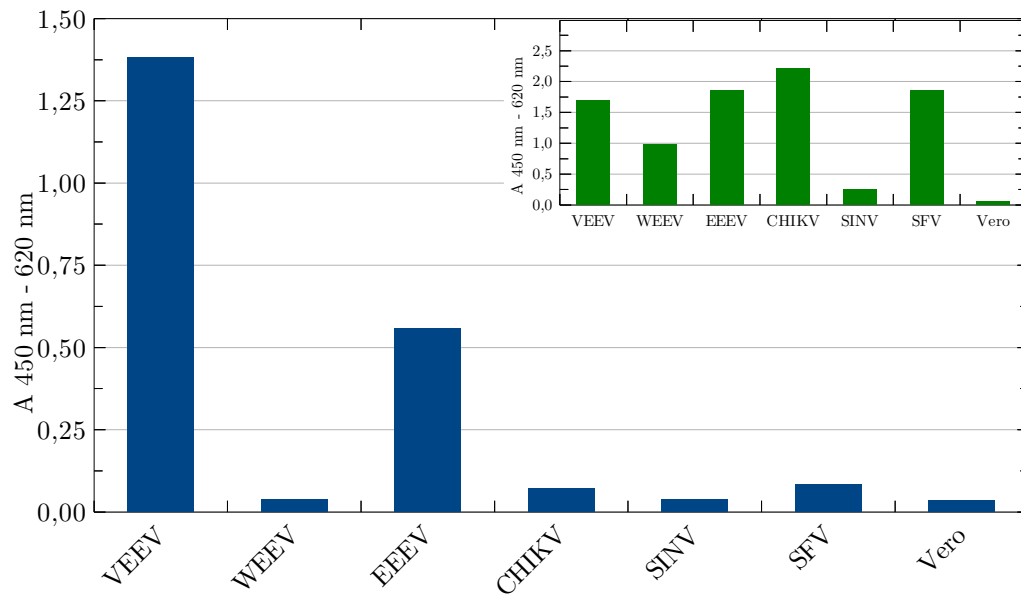


Abbildung 3.7: Sandwich-ELISA unterschiedlicher Alphavirus-Stämme mit scFv-Fc ToR67-3B4 als Detektionsantikörper – Zur Untersuchung der Spezifität des scFv-Fc ToR67-3B4 wurden die Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit einem Alphavirus-spezifischen mAK Mix beschichtet ($3 \mu\text{g/mL}$ Gesamtmenge) und mit den entsprechenden Viruspartikeln inkubiert. Die Analyse der Detektoreigenschaften erfolgte mit 100 ng des biotinylierten scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 und dem Nachweis mittels Streptavidin-HRP-Konjugat. Der Bildeinsatz zeigt das Ergebnis der Kontrolle mit dem Alphavirus-spezifischen mAK Mix als Fänger und Detektor. CHIKV: Chikungunya Virus; SINV: Sindbis Virus; SFV: Semliki Forest Virus, PIXV: Pixuna Virus; Fe37c: VEEV Everglades (Daten: WIS)

gerantikörper abwechselnd mit einem Alphavirus-spezifischem mAK-Mix eingesetzt (Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8).

Mit scFv-Fc ToR67-3B4 als Nachweisantikörper wurden die VEE-Viren des Stammes TC83 spezifisch nachgewiesen. Außerdem wurde EEEV, ein taxonomisch naher Verwandter des VEE-Komplexes, spezifisch nachgewiesen. Alle weiteren Stämme wurden dagegen nicht nachgewiesen. Die Kontrolle mit dem Alphavirus-spezifischen mAK Mix zeigt, dass alle Virustypen außer SINV gebunden und nachgewiesen werden können (Bildeinsatz in Abbildung 3.7).

Wurde der scFv-Fc ToR67-3B4 als Fängerantikörper eingesetzt, konnte VEEV TC83 spezifisch nachgewiesen werden. Zusätzlich dazu wurde mit EEEV ein taxonomisch nah verwandter Virus nachgewiesen. Außerdem wurden die Vi-

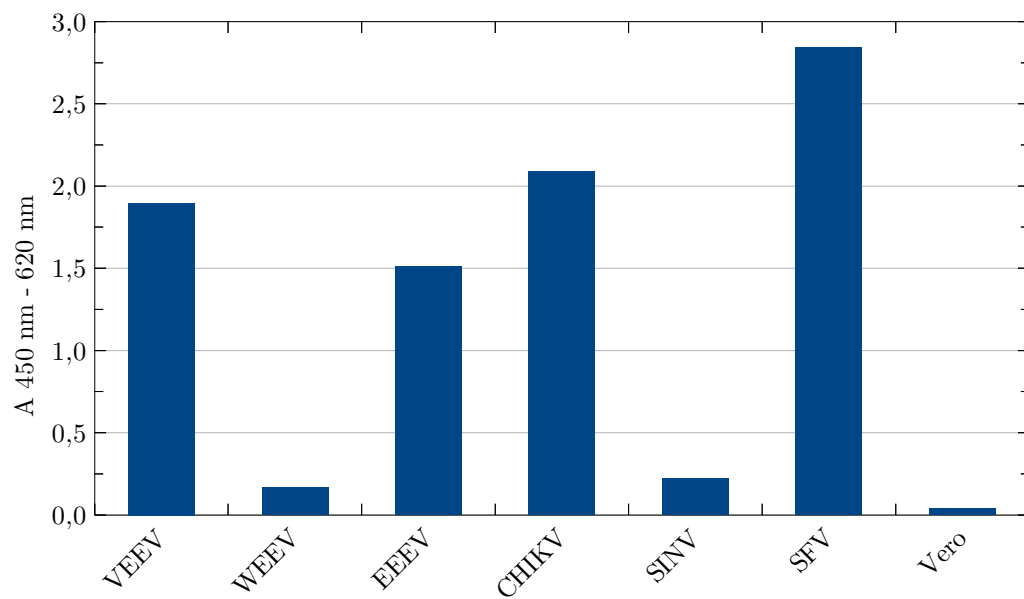


Abbildung 3.8: Sandwich-ELISA mit scFv-Fc ToR67-3B4 als Fängerantikörper und Nachweis mit unterschiedlichen mAKs – Zur Untersuchung der Spezifität des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 wurden die Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit scFv-Fc ToR67-3B4 beschichtet ($3\text{ }\mu\text{g/mL}$ Gesamtmenge) und mit den entsprechenden Viruspartikeln inkubiert. Die Analyse der Fängereigenschaften erfolgte durch die Inkubation mit dem biotinylierten VEEV spezifischen mAK VEE WIS1 bzw. dem biotinylierten Alphavirus-spezifischen mAK SFV 12/2 und deren Nachweis über ein Streptavidin-HRP-Konjugat. (aus 2 Experimenten kombinierte Grafik, siehe dazu Anhang S. 134) (Daten: WIS)

russtämme CHIKV und SFV durch den scFv-Fc ToR67-3B4 gebunden, obwohl beide zum SFV Komplex gehören, der als taxonomisch weiter entfernt gilt.

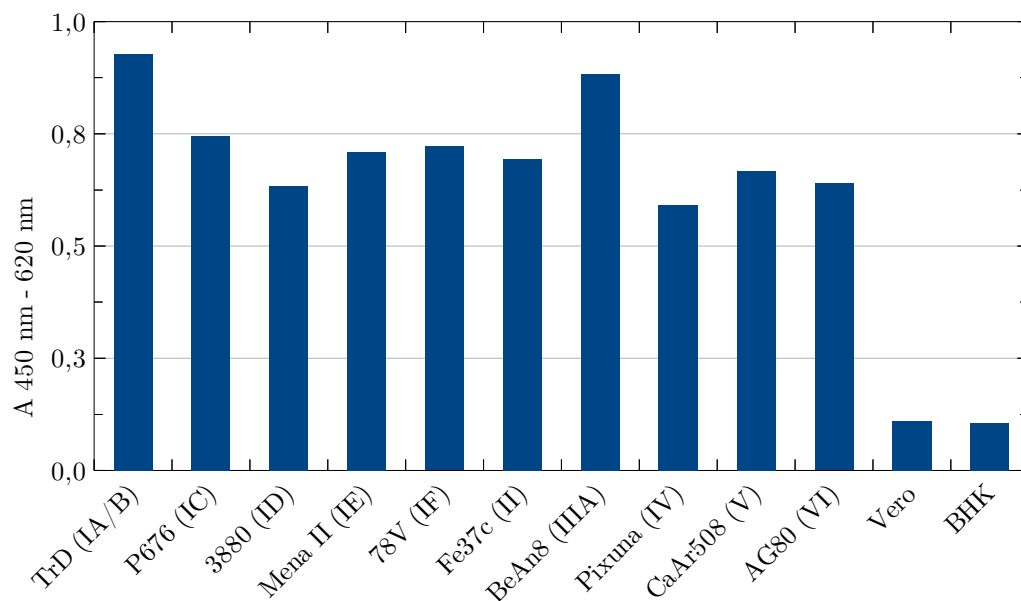


Abbildung 3.9: Direkter ELISA auf VEEV-Subtypen – Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines ELISAs auf allen Subtypen der VEE-Viren. Gereinigte Viren aller Subtypen wurden direkt in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit dem scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 (1 mg/mL) detektiert. Der Nachweis erfolgte mit TMB-Substrat. Kontrollen: Zellkulturüberstand nicht infizierter Vero- bzw. BHK-Zellen (*Baby Hamster Kidney*) (Daten: dstl)

Zur Bestimmung der Spezifität für die unterschiedlichen VEEV-Subtypen wurde ein direkter ELISA durchgeführt. Dabei wurden mittels Saccharose-Dichtezentrifugation gereinigte VEE-Viren jeden Subtyps direkt in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit dem scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 nachgewiesen (Abbildung 3.9).

Mittels direktem ELISA wurde gezeigt, dass der Nachweis von allen genutzten Subtypen der VEE-Viren mit dem scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 durchgeführt werden kann, wobei die Spezifität für die einzelnen Subtypen fast keine Unterschiede aufweist.

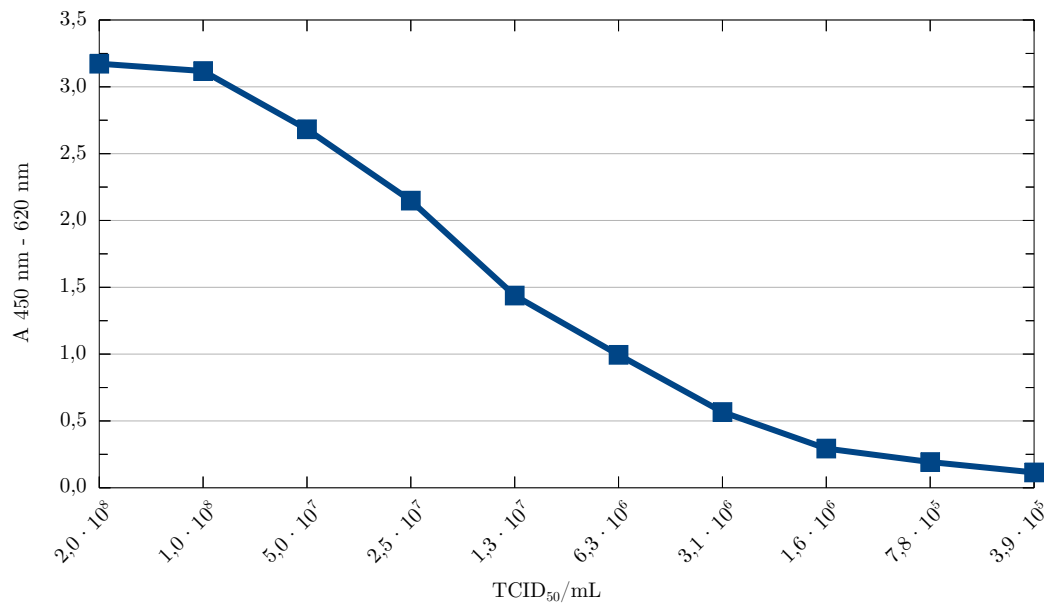


Abbildung 3.10: Nachweisgrenze des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 –

Die Bestimmung der Nachweisgrenze des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 wurde im Sandwich-ELISA durchgeführt, wobei 300 ng des Fängerantikörpers VEE WIS1 in einer Mikrotiterplatte immobilisiert wurden. Die eingesetzten Viren des Impfstamms TC83 wurden in 2-fach Verdünnungsstufen titriert, anschließend erfolgte die Detektion mit dem biotinylierten scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 und der Nachweis mittels Streptavidin-HRP-Konjugat (Daten: WIS).

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Der VEEV-spezifische mAK VEE WIS1 wurde als Fänger eingesetzt, mit dem biotinylierten scFv-Fc-Antikörper erfolgte der Nachweis der titrierten Viren (Abbildung 3.10). Der Nachweis von VEE-Viren war bis zu einer TCID₅₀/mL von $3,1 \cdot 10^6$ möglich.

3.7 Identifizierung des Antigens von scFv-Fc ToR67-3B4

Die Proteinhülle der VEE-Viren besteht aus den zwei Glycoproteinen E1 und E2. Um die Spezifität des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 für eines der beiden Glycoproteine zu bestimmen, wurden gereinigte VEEV TC83-Viren in einem PAA Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch auf-

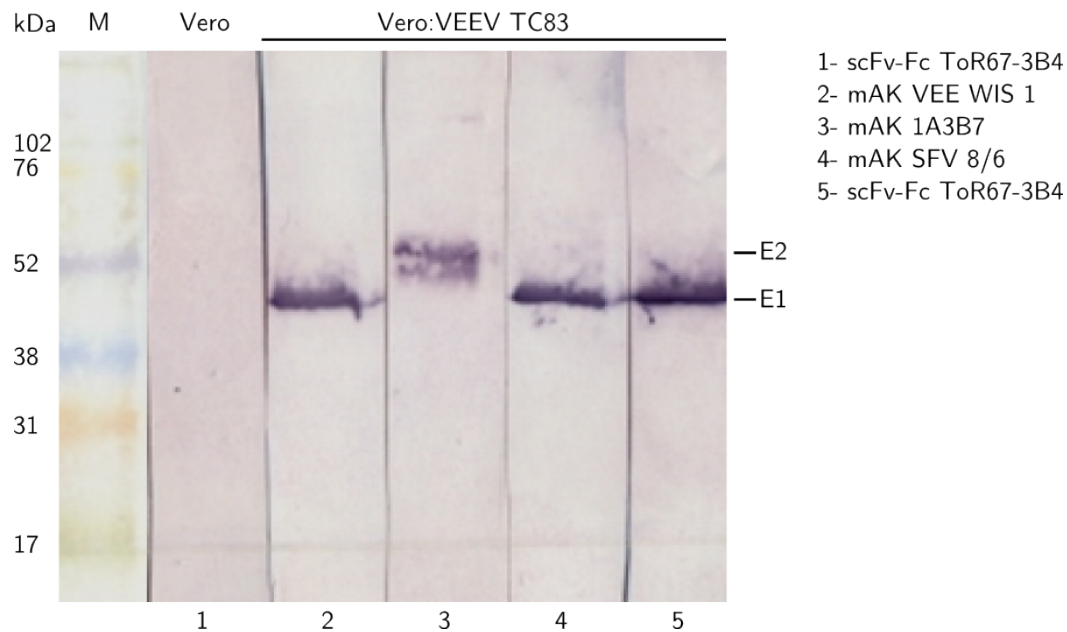


Abbildung 3.11: Bestimmung des viralen Antigens für den scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 mittels Western-Blot und Immunfärbung – Zur Bestimmung des Antigens von scFv-Fc ToR67-3B4 wurden Viren des Stammes VEEV TC83 auf 56 °C erhitzt und in einem 15 % PAA Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Blotten auf eine Nitrocellulose Membran wurden das biotinylierte Fusionsprotein ToR67-3B4-Fc sowie drei biotinylierte Kontrollantikörper auf den Membranstreifen inkubiert. Zum Nachweis von scFv-Fc-Antikörper und mAKs wurde ein Streptavidin-AP Konjugat genutzt. (Abbildung des WIS, modifiziert)

getrennt. Nach dem Übertragen auf eine Nitrocellulose Membran wurden die Virusproteine mit dem biotinylierten scFv-Fc ToR67-3B4 nachgewiesen. Als Kontrollen wurden die E1-spezifischen mAKs SFV 8/6 [103] und VEE WIS1, sowie der E2-spezifische mAK 1A3B7 [104] eingesetzt (Abbildung 3.11).

Die E1-spezifischen mAKs VEE WIS1 und SFV 8/6 binden an das E1-Protein mit einem Molekulargewicht von 48 – 50 kDa, während der E2-spezifische mAK 1A3B7 an das E2 Protein mit einem Molekulargewicht von 50 – 52 kDa bindet. In parallelen Ansätzen zeigte der scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 eine spezifische Bindung an E1. In einer weiteren SDS-PAGE-Analyse unter reduzierenden Bedingungen und anschließendem Western-Blot und Immunfärbung konnte keine Bindung des scFv-Fc-Antikörpers nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

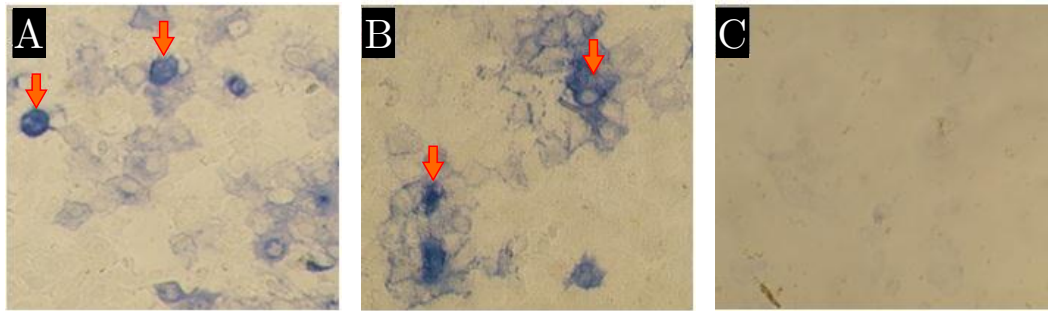


Abbildung 3.12: Immunhistochemischer Nachweis von VEEV TrD-infizierten Zellen – Vero-Zellen wurden mit VEEV TrD infiziert und 24 Stunden nach Infektion mit Formalin fixiert. Nach Fixierung wurden die Zellen mit biotinyliertem ToR67-3B4-Fc (A) bzw. biotinyliertem mAK SFV 8/6 (B) inkubiert. Die Bindung der Antikörper wurde mittels Streptavidin-HRP Konjugat und anschließender Farbreaktion über TMB Substrat nachgewiesen. Bild C zeigt nicht infizierte, mit scFv-Fc ToR67-3B4 inkubierte, Vero Zellen. (Abbildung und Daten: WIS, modifiziert)

3.8 Immunhistochemischer Nachweis VEEV-infizierter Zellen

Mittels Immunhistochemie sollte eine Infektion mit VEEV in lebenden Zellen nachgewiesen werden. Dazu wurden Vero Zellen mit VEEV TrD infiziert und die Infektion nach 24 Stunden mit dem biotinylierten scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 untersucht.

Die Bindung des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 entspricht der Bindung des mAK SFV 8/6, der als Positivkontrolle für einen Infektionsnachweis eingesetzt wurde (Abbildung 3.12). Demnach ist der immunhistochemische Nachweis des Virusantigens in infizierten Zellen mit dem scFv-Fc ToR67-3B4 möglich. Die Spezifität wurde durch die Negativkontrolle, in der keine Färbung sichtbar war, bestätigt. In einem weiteren Experiment, in dem der VEE-Virusstamm TC83 genutzt wurde, konnte die Infektion lebender Zellen ebenfalls verifiziert werden (Daten nicht gezeigt, [96]).

3.9 Charakterisierung der WEEV-spezifischen scFv-Fc-Antikörper

Die WEEV-spezifischen scFv-Fc-Antikörper ToR68-2C3 und ToR68-2E9 wurden mittels Sandwich-ELISA weiter charakterisiert. Dabei wurde ihre Eignung als Fänger- oder Detektor-Antikörper in Kombination mit dem mAK 12/2 bzw. 12/2b untersucht.

Als Detektionsantikörper konnte der scFv-Fc-Antikörper ToR68-2C3 nur eingeschränkt eingesetzt werden, da mit steigender Konzentration der Nachweis deutlich unspezifisch wurde. Ein spezifischer Nachweis wurde mit Mengen zwischen 10 und 100 ng/well bei einem Signal:Rauschen-Verhältnis von 3:1 bis 5:1 erreicht. Wurde der scFv-Fc-Antikörper ToR68-2C3 als Fänger eingesetzt, war ein spezifischer Nachweis von Viren mit dem biotinylierten monoklonalen Antikörper mAK 12/2b in einem Bereich von 1 bis 100 ng/well bei einem Signal:Rauschen-Verhältnis von 6:1 bis 8:1 möglich (Abbildung 3.13).

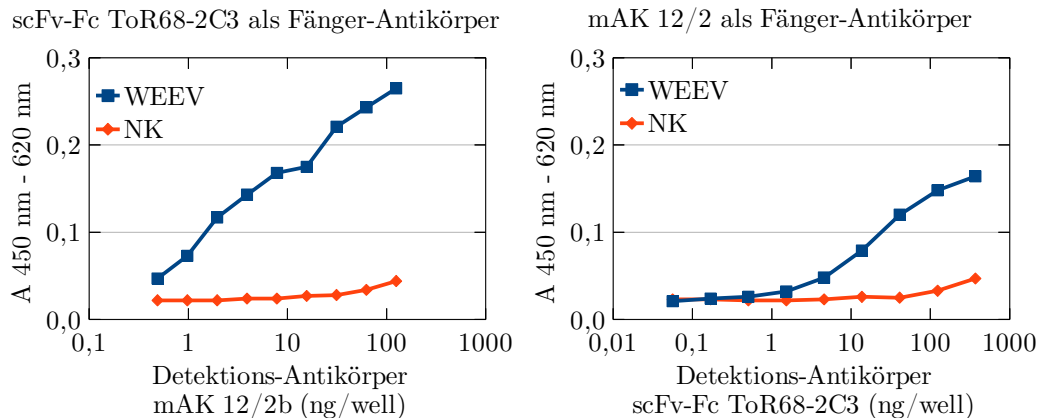


Abbildung 3.13: WEEV Nachweis mit dem scFv-Fc-Antikörper ToR68-2C3

– Um einen spezifischen Nachweis von WEEV durchzuführen, wurde der scFv-Fc-Antikörper ToR68-2C3 in einem Sandwich-ELISA als Fänger (links) und als Detektionsantikörper (rechts) eingesetzt. Dazu wurden die Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit 300 ng scFv-Fc ToR68-2C3 bzw. mAK 12/2 beschichtet. Zellkulturüberstand von WEEV-infizierten Vero-Zellen wurde in den Kavitäten inkubiert und die gebundenen Viren wurden mittels mAK 12/2b bzw. scFv-Fc ToR68-2C3 detektiert. Der Nachweis erfolgte über ein Streptavidin-HRP-Konjugat bei mAK12/2b bzw. über ein Ziege-anti-Mensch IgG Fc-spez. HRP-Konjugat bei scFv-Fc ToR68-2C3. NK: Negativkontrolle, Zellkulturüberstand ohne Viren

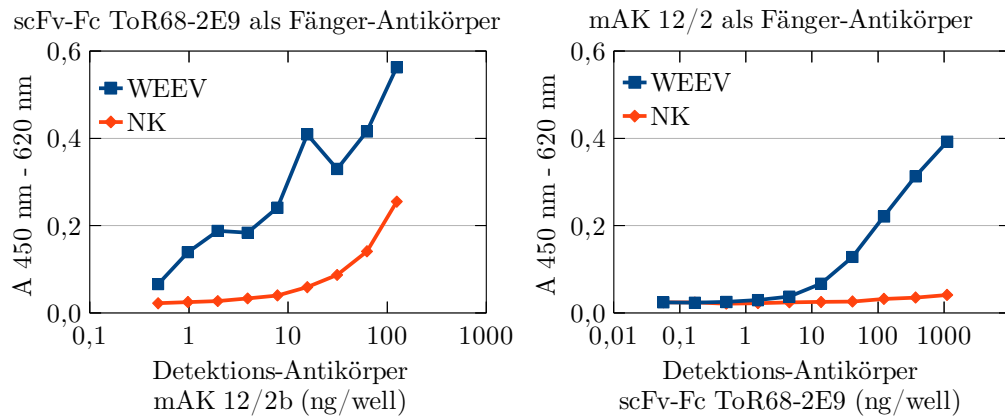


Abbildung 3.14: WEEV Nachweis mit dem scFv-Fc-Antikörper ToR68-2E9 – Um einen spezifischen Nachweis von WEEV durchzuführen, wurde der scFv-Fc-Antikörper ToR68-2E9 in einem Sandwich-ELISA als Fänger (links) und als Detektor (rechts) eingesetzt. Dazu wurden die Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit 300 ng scFv-Fc ToR68-2E9 bzw. mAK 12/2 beschichtet. Zellkulturüberstand von WEEV infizierten Vero Zellen wurde in den Kavitäten inkubiert und die gebundenen Viren wurden mittels mAK 12/2b bzw. scFv-Fc ToR68-2E9 detektiert. Der Nachweis erfolgte über ein Streptavidin-HRP-Konjugat bei mAK12/2b bzw. über ein Ziege-anti-Mensch IgG Fc-spez. HRP-Konjugat bei scFv-Fc ToR68-2E9. NK: Negativkontrolle, Zellkulturüberstand ohne Viren

Der scFv-Fc-Antikörper ToR68-2E9 konnte als spezifischer Detektionsantikörper eingesetzt werden. Der Nachweis von WEE-Viruspartikeln war ab einer Konzentration von etwa 50 ng/well möglich, eine unspezifische Bindung wurde bis zu einer Konzentration von 1000 ng/well nicht festgestellt (Signal:Rauschen \approx 5:1 bis 10:1). Als Fänger eingesetzt konnte beim scFv-Fc-Antikörper ToR68-2E9 ebenfalls eine spezifische Bindung an die WEE-Viruspartikel nachgewiesen werden. Der Nachweis mit dem biotinylierten monoklonalen Antikörper mAK SFV 12/2b war in Konzentrationen zwischen 1 und 30 ng/well spezifisch (Signal:Rauschen \approx 5:1 bis 7:1), mit steigenden Konzentrationen erhöhte sich die unspezifische Bindung deutlich (Abbildung 3.14).

In zusätzlichen Experimenten mittels Sandwich-ELISAs am WIS wurde ebenfalls gezeigt, dass die scFv-Fc-Antikörper ToR68-2C3 und -2E9 effektiv als Fänger-Antikörper eingesetzt werden konnten. Die weiteren scFv-Fc-Antikörper ToR69-3A2 und -3C4 wurden ebenfalls getestet und konnten sowohl als Fänger- als auch als Detektions-Antikörper in Kombinationen mit anderen

scFv-Fc-Antikörpern und auch monoklonalen Antikörpern erfolgreich eingesetzt werden [96].

3.10 Immunhistochemischer Nachweis WEEV-infizierter Zellen

Durch immunhistochemische Experimente sollte eine Infektion mit WEEV in lebenden Zellen nachgewiesen werden. Dazu wurden Vero-Zellen mit WEEViren infiziert und die Infektion nach 24 Stunden mit den biotinylierten scFv-Fc-Antikörpern ToR69-3A2 und -3C4 untersucht.

Die Bindung beider scFv-Fc-Antikörper konnte durch die intensive Blaufärbung der infizierten Zellen gezeigt werden (Abbildung 3.15). Die Zellen der Negativkontrolle, bei der keine Antikörper eingesetzt wurden, zeigen keine Färbung, wodurch unspezifische Reaktionen des Streptavidin-HRP-Konjugats ausgeschlossen werden konnten. Der immunhistochemische Nachweis des Virusantigens in infizierten Zellen mit den scFv-Fc-Antikörpern ToR69-3A2 und ToR69-3C4 ist demnach möglich.

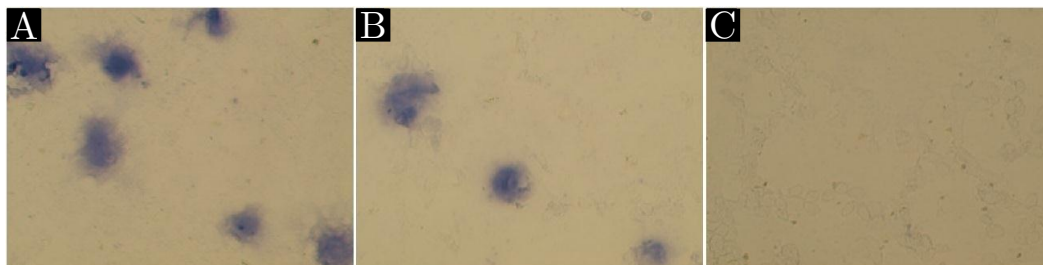


Abbildung 3.15: Immunhistochemischer Nachweis von WEEV-infizierten Zellen – Vero-Zellen wurden mit WEEV infiziert und 24 Stunden nach Infektion auf Glasobjektträger aufgebracht und mit Formalin fixiert. Nach Fixierung wurden die Zellen mit biotinyliertem scFv-Fc-Antikörper ToR69-3A2 (A), bzw. biotinyliertem scFv-Fc-Antikörper ToR69-3C4 (B) inkubiert. Die Bindung der Antikörper wurde mittels Streptavidin-HRP-Konjugat und anschließender Farbreaktion über TMB-Substrat nachgewiesen. Bild C zeigt infizierte, ohne Antikörper inkubierte, Vero-Zellen (Abbildung und Daten: WIS, modifiziert).

3.11 *In-Vitro*-Neutralisation von VEE-Viren

Um die neutralisierenden Eigenschaften des VEEV-spezifischen scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 zu untersuchen, wurde getestet, ob die Infektion von Vero-Zellen durch VEEV in Gegenwart des scFv-Fc-Antikörpers inhibiert wird. Vero B4-Zellen wurden mit unterschiedlichen Virus-Antikörper-Gemischen ($5 \cdot 10^4$ TCID₅₀/ml VEE-Viruspartikel mit unterschiedlichen Mengen der Antikörper) inkubiert und nach Inkubation mit Formalin fixiert. Um eine Infektion nachzuweisen, wurden die VEE-Viren in den infizierten Zellen durch den monoklonalen biotinylierten anti-VEEV-Antikörpers SFV 8/6 detektiert und gefärbt. Als Positivkontrolle wurden die Viren ohne Antikörper hinzugegeben, was zu einer Infektion der Zellen führt. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Vero-Zellen, wodurch keine Bindung der Antikörper und somit auch keine Farbreaktion stattfinden kann. Die Absorptionswerte der Positivkontrolle wurden als Maximum auf 100 % gesetzt, um die Infektiösität der mit Antikörpern inkubierten Viren zu vergleichen. Eine Reduktion der Infektion um mindes-

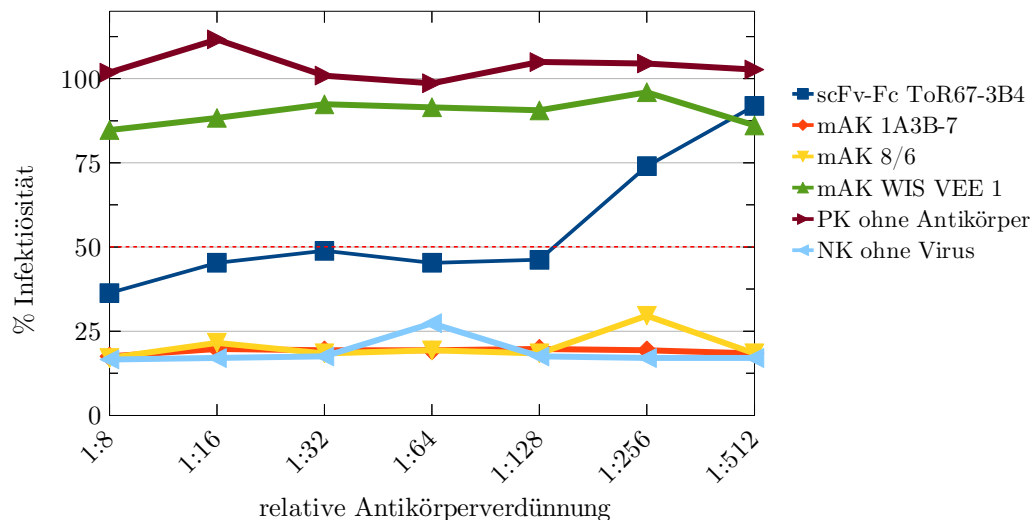


Abbildung 3.16: Neutralisation von VEEV TC83 durch den scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 – Zum Nachweis der prozentualen Infektiösität wurden Vero B4-Zellen mit einem Virus-Antikörper-Gemisch inkubiert und nach 20–24 Stunden mit Formalin fixiert. Nach Inkubation mit dem monoklonalen biotinylierten Antikörper SFV 8/6 und dessen Nachweis über Streptavidin-HRP wurde die Absorption bei 450 nm gemessen und mit den Positiv- und Negativkontrollen die prozentuale Infektiösität ermittelt. (Daten: WIS)

tens 50 % wurde als neutralisierende Aktivität des mAKs bzw. scFv-Fc-Antikörpers bezeichnet. Zum Vergleich wurden der monoklonale Antikörper mAK 1A3B7 [105] und zwei Antikörper des WIS (mAK WIS VEE1 und mAK 8/6) eingesetzt, wobei mAK 1A3B7 und mAK 8/6 als Positiv-, der mAK WIS VEE1 als Negativkontrolle für die Neutralisation genutzt wurde. Die Ausgangskonzentrationen von allen genutzten Antikörper lagen in einem Bereich zwischen 0,5 und 1 mg/mL.

Der Stamm VEEV TC83 des Virus-Subtyps IAB wurde bis zu einer relativen Antikörperverdünnung von 1:128 neutralisiert, bei höheren Verdünnungen wurde eine erhöhte Infektiösität festgestellt. Die Positivkontrolle zeigte bis zur maximalen Verdünnungsstufe eine Reduktion der Infektiösität um 100% (Abbildung 3.16).

Gegenüber dem Stamm VEEV TrD konnte keine neutralisierende Wirkung des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 gezeigt werden. Die Kontrollantikörper mAK 1A3b7 und SFV 8/6 neutralisierten den Stamm VEEV TrD bis zur maximalen

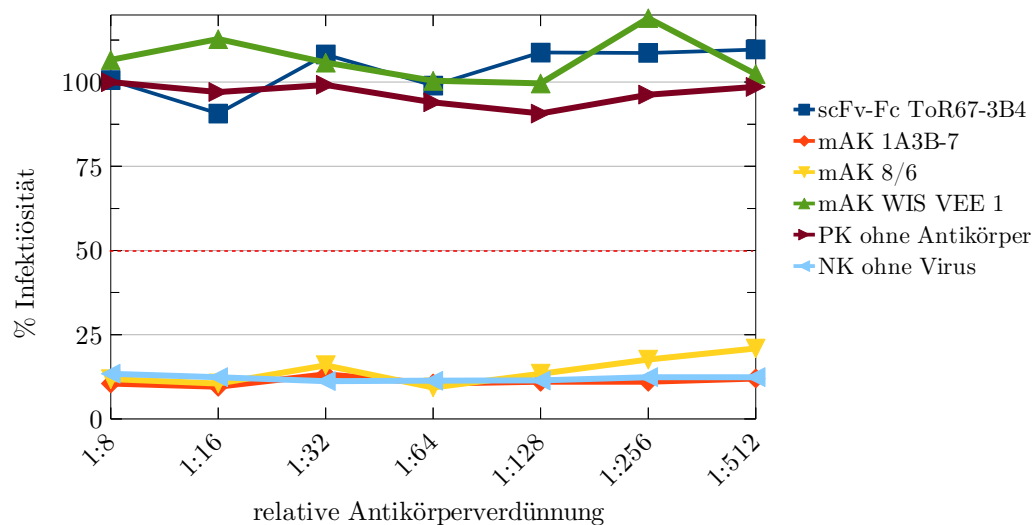


Abbildung 3.17: Neutralisation von VEEV TrD durch den scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 – Zum Nachweis der prozentualen Infektiösität wurden Vero B4-Zellen mit einem Virus-Antikörper-Gemisch inkubiert und nach 20–24 Stunden mit Formalin fixiert. Nach Inkubation mit dem monoklonalen biotinylierten Antikörper SFV 8/6 und dessen Nachweis über Streptavidin-HRP wurde die Absorption bei 450 nm gemessen und mit den Positiv- und Negativkontrollen die prozentuale Infektiösität ermittelt. (Daten: WIS)

getesteten Verdünnungsstufe zu nahezu 100 %, während der mAK WIS VEE1 keine detektierbare neutralisierende Wirkung vermittelte (Abbildung 3.17).

Der Stamm Fe37c des Subtyps II konnte mit hohen Antikörperkonzentrationen neutralisiert werden, die Infektiösität stieg aber mit steigender Verdünnung linear an. Eine Reduktion der Infektiösität wurde nur bei den Verdünnungsstufen 1:8 und 1:16 erzielt. Die Positivkontrollen zeigten bis zu den maximalen Verdünnungen eine fast vollständige Reduktion der Infektiösität. Der als Negativkontrolle eingesetzte mAK WIS VEE1 zeigte keine infektionshemmende Wirkung (Abbildung 3.18).

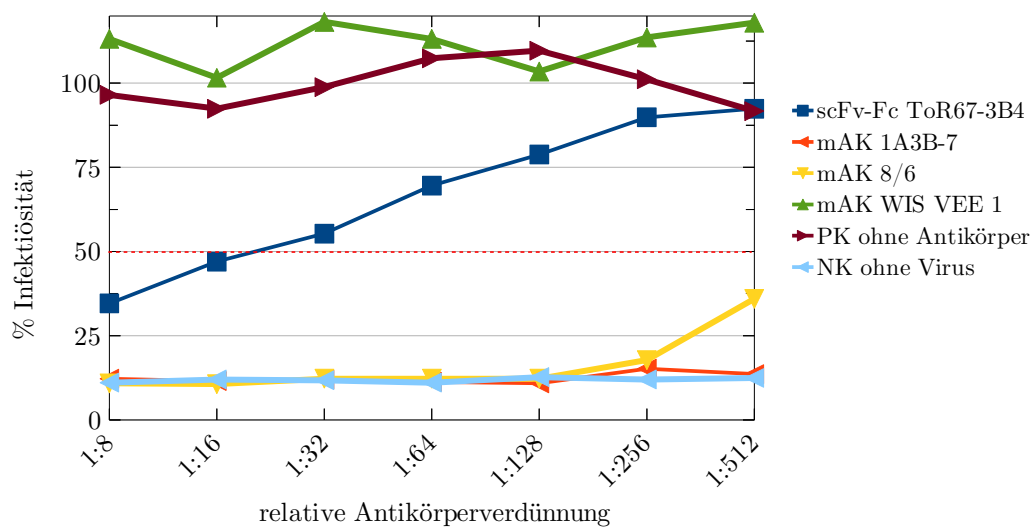


Abbildung 3.18: Neutralisation von VEEV Fe37c durch den scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 – Zum Nachweis der prozentualen Infektiösität wurden Vero B4-Zellen mit einem Virus-Antikörper-Gemisch inkubiert und nach 20–24 Stunden mit Formalin fixiert. Nach Inkubation mit dem monoklonalen biotinylierten Antikörper SFV 8/6 und dessen Nachweis über Streptavidin-HRP wurde die Absorption bei 450 nm gemessen und mit den Positiv- und Negativkontrollen die prozentuale Infektiösität ermittelt. (Daten: WIS)

In Zusammenarbeit mit dem dstl (Porton Down, England) wurde die Neutralisation von VEEV mittels *Plaque Assay* [91] untersucht. Dabei konnte ebenfalls eine Neutralisation des VEEV-Stamms Fe37c und zusätzlich eine Neutralisation des VEEV-Stamms BeAn8 (früher Subtyp IIIA) durch den scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 nachgewiesen werden; der Virustiter wurde um die Hälfte oder mehr reduziert. Zusätzlich dazu wurde gezeigt, dass die verbliebenen Plaques

bei Infektion mit BeAn8 und Fe37c in Anwesenheit dieses scFv-Fc-Antikörpers eine deutlich geringere Größe aufwiesen. Auch in diesem Experiment konnte keine Neutralisation des Stammes TrD nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt [96]).

3.12 Bestimmung der Halbwertszeit des VEEV-spezifischen scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4

Zur weiteren Analyse der antiviralen Eigenschaften des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 wurden Experimente im Mausmodell durchgeführt. Die Abnahme der Konzentration des scFv-Fc-Antikörpers wurde durch intraperitoneale Injektion und folgende Konzentrationsbestimmungen im Serum untersucht. Aus den Schwanzvenen der Mäuse wurden zwischen acht Stunden und 25 Tagen nach Injektion Serumproben entnommen und die scFv-Fc-Konzentration in einem ELISA auf VEEV TC83 bestimmt. Da nach fünf Tagen keine Konzentrationsbestimmung im Serum mehr möglich war, sind nur die Werte der ersten fünf Tage in der Berechnung berücksichtigt (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Konzentrationsbestimmung des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 im Mausserum – Nach intraperitonealer Gabe des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 wurden nach 8 h und an den Tagen 1, 3, 5, 10, 15 und 25 Serumproben aus den Schwanzvenen der Mäuse entnommen und die Konzentration des scFv-Fc-Antikörpers mittels ELISA bestimmt. Zur Berechnung der Konzentration wurde eine Standardreihe mit dem scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 erstellt.

scFv-Fc Konzentration	Tag			
($\mu\text{g/mL}$)	1/3	1	3	5
Maus 1	53,06	26,80	14,87	7,27
Maus 2	44,48	20,79	11,27	6,09
Maus 3	46,33	21,72	10,36	4,84

Die Werte aus der Konzentrationsbestimmung wurden logarithmiert und Mittelwerte aus den Werten der drei untersuchten Mäuse gebildet. Diese Werte wurden gegen die Tage der Konzentrationsbestimmungen aufgetragen. Eine

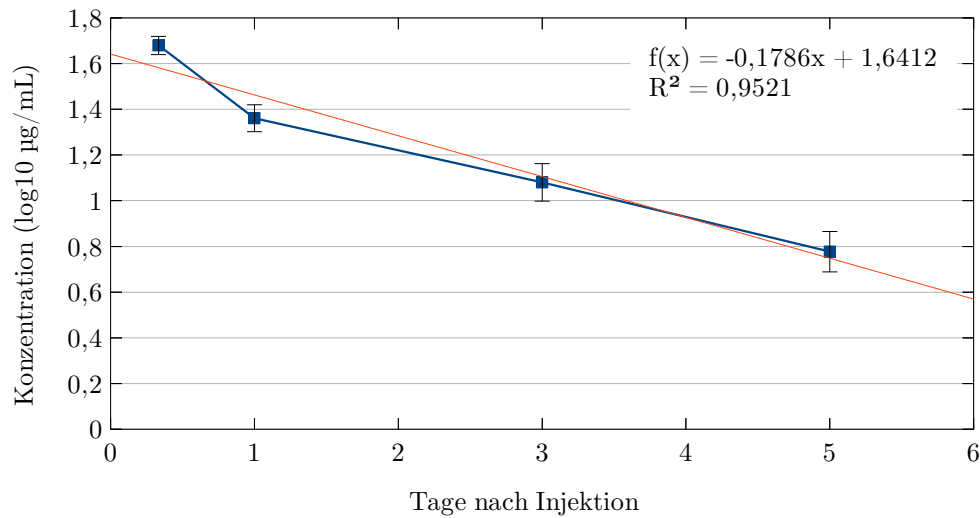


Abbildung 3.19: Berechnung der in vivo Halbwertszeit des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 – Drei Mäusen wurden intraperitoneal etwa 100 µg des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 injiziert und nach 8 Stunden bis 25 Tagen Serumproben aus der Schwanzvene entnommen. Die Konzentration des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 wurde mittels ELISA bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden logarithmiert und ein Mittelwert aus den Ergebnissen der 3 Mäuse gebildet. Diese Werte wurden gegen die Tage nach Injektion aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. (Daten: dstl)

lineare Regression wurde durchgeführt und die Geradengleichung sowie das Bestimmtheitsmaß erhalten (Abbildung 3.19).

Die dadurch bestimmte negative Geradensteigung von $m = -0,1786 \text{ d}^{-1}$ kann direkt zur Bestimmung der Halbwertszeit eingesetzt werden. Mit der Gleichung aus Kapitel 2.4.1 wurde die Halbwertszeit des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 zu 1,69 d berechnet.

3.13 *In Vivo*-Neutralisation des VEEV spezifischen scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4

Um zu untersuchen, ob der scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 nach einer Infektion mit VEE-Viren unterschiedlicher Stämme protektiv bzw. neutralisierend

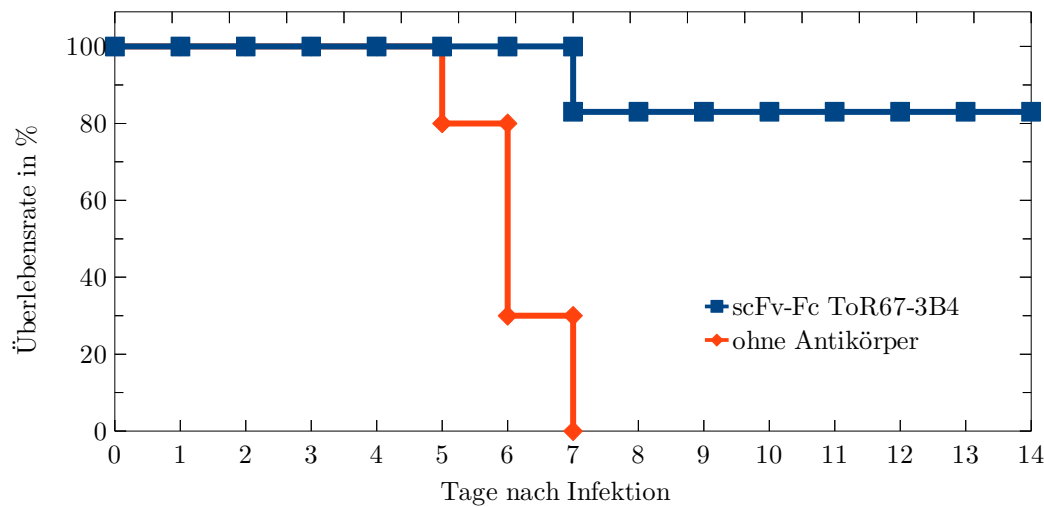


Abbildung 3.20: Überlebenskurve von mit TrD-Viren infizierten BALB/c-Mäusen – Insgesamt 16 BALB/c-Mäuse wurden durch ein Aerosol mit etwa 100-fach LD₅₀ VEEV TrD infiziert. Nach 6 Stunden erfolgte bei 6 Mäusen die intraperitoneale Injektion von 100 µg scFv-Fc ToR67-3B4. (Daten: dstl)

wirkt, wurden BALB/c Mäuse mit etwa 100-fach LD₅₀ der VEEV-Stämme TrD (Subtyp IAB), Mena II (Subtyp IE), Fe37c (Subtyp II) und BeAn8 (Subtyp IIIA) per Aerosol infiziert. Sechs Stunden später erfolgte die intraperitoneale Gabe von 100 µg des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4, als Kontrolle wurde entweder kein Virus oder ein WEEV-spezifischer scFv-Fc-Antikörper genutzt. Die Mäuse wurden für 14 Tage zwei Mal täglich auf Anzeichen einer Infektion untersucht und bei schweren Erkrankungen getötet.

Bei intraperitonealer Injektion von 100 µg des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4-Fc sechs Stunden nach Infektion mit dem Stamm VEEV TrD konnte eine stark erhöhte Überlebensrate von 80 % nach 14 Tagen beobachtet werden. Sämtliche infizierten Mäuse aus der Kontrollgruppe ohne Antikörper starben innerhalb der ersten sieben Tage (Abbildung 3.20).

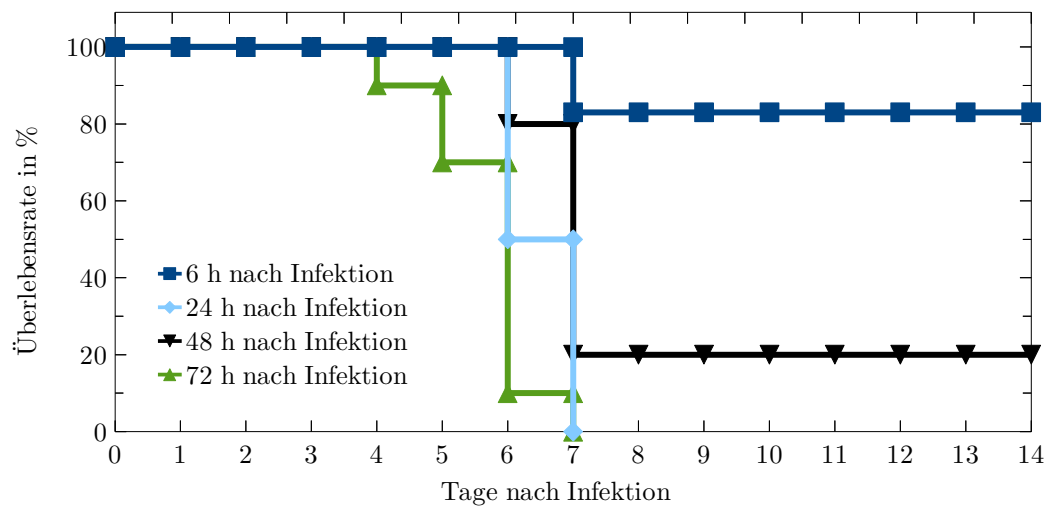


Abbildung 3.21: Überlebenskurven von mit TrD-Viren infizierten BALB/c-Mäusen, Zeitreihe – Zur Bestimmung des Einflusses einer späteren Behandlung wurden jeweils 10 BALB/c-Mäuse durch ein Aerosol mit etwa 100-fach LD_{50} VEEV TrD infiziert. Nach 24, 48 oder 72 h erfolgte die intraperitoneale Injektion von 100 μ g scFv-Fc ToR67-3B4. Die Werte der Sterberaten für eine Injektion, die bereits nach 6 h durchgeführt wurde, sind zum Vergleich gezeigt. (Daten: dstl)

Um den Einfluss einer späteren Impfung auf die Überlebensrate zu untersuchen, wurden je 10 BALB/c-Mäuse nach 24, 48 oder 72 h nach der Infektion durch TrD-Viren mit dem scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 behandelt (Abbildung 3.21).

Der Vergleich von unterschiedlichen Zeitpunkten der Behandlung zeigt, dass die Überlebensrate bei einer Behandlung nach 24 h oder später deutlich abnimmt. Die Überlebensrate bei Injektion nach 24 bzw. 72 h ist im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.20) nicht erhöht. Nur bei einer Injektion nach 48 h überlebten 20 % der Mäuse den Testzeitraum.

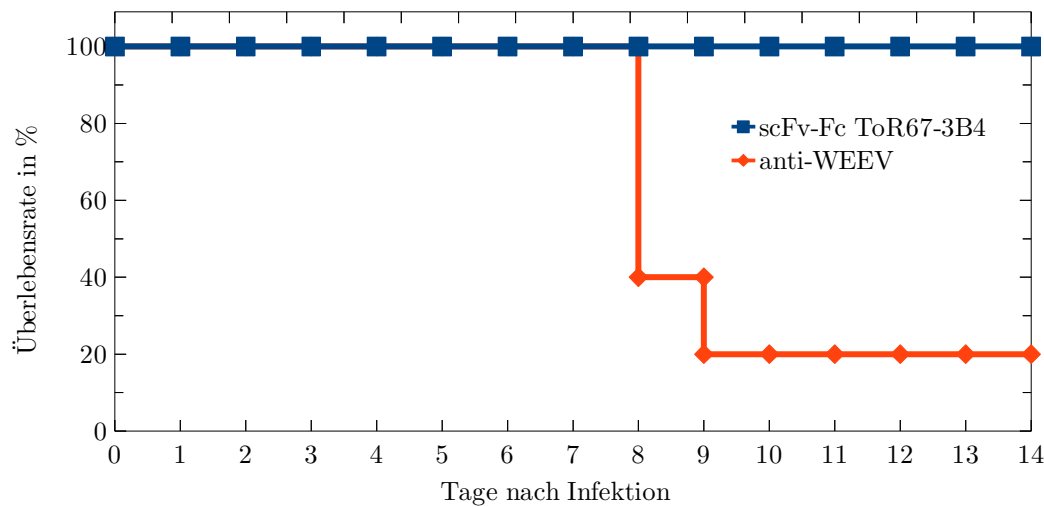


Abbildung 3.22: Überlebenskurve von mit Mena II-Viren infizierten BALB/c-Mäusen – Insgesamt 16 BALB/c-Mäuse wurden durch ein Aerosol mit etwa 100-fach LD₅₀ VEEV Mena II infiziert. Nach 6 Stunden erfolgte bei 6 Mäusen die intraperitoneale Injektion von 100 µg scFv-Fc ToR67-3B4, bei 10 Mäusen wurde eine intraperitoneale Injektion von 100 µg eines WEEV-spezifischen Antikörpers durchgeführt. (Daten: dstl)

Bei der Infektion von Mäusen mit dem Stamm Mena II des Subtyps IE konnte eine auf 100 % erhöhte Überlebensrate beobachtet werden, wenn sie mit dem scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 behandelt wurden. 80 % der Mäuse aus der Kontrollgruppe, die mit einem WEEV-spezifischen scFv-Fc-Antikörper behandelt wurden, starben innerhalb der ersten neun Tage (Abbildung 3.22).

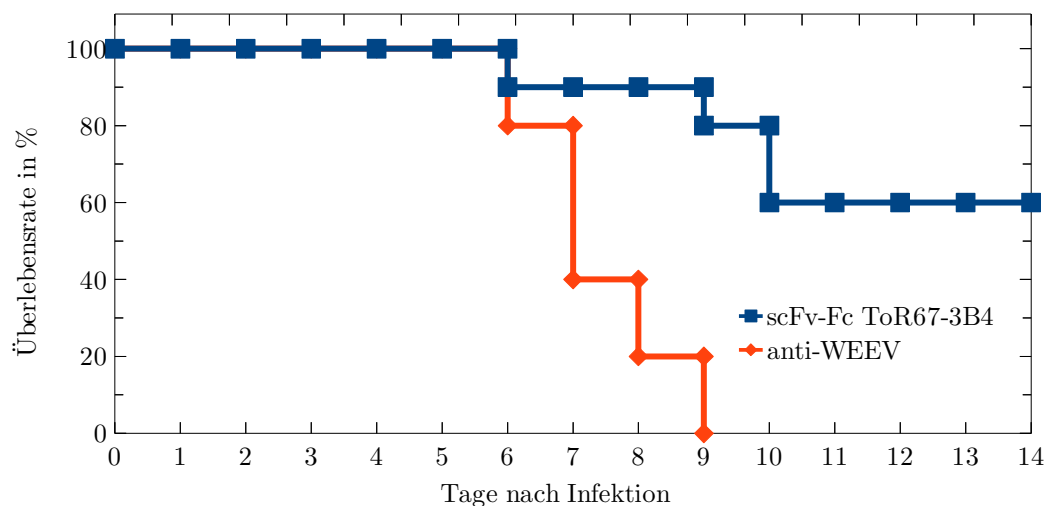


Abbildung 3.23: Überlebenskurve von mit Fe37c-Viren infizierten BALB/c-Mäusen – BALB/c-Mäuse wurden durch ein Aerosol mit etwa 100-fach LD₅₀ VEEV Fe37c infiziert. Nach 6 Stunden erfolgte bei 6 Mäusen die intraperitoneale Injektion von 100 µg scFv-Fc ToR67-3B4, bei 10 Mäusen wurde eine intraperitoneale Injektion von 100 µg eines WEEV-spezifischen Antikörpers durchgeführt. (Daten: dstl)

Alle Mäuse, die mit dem Stamm Fe37c des Subtyps II infiziert wurden, starben mit Kontrollantikörper behandelt bis zum Tag 8. Bei den mit scFv-Fc ToR67-3B4 behandelten Mäusen überlebten 60 % der infizierten Mäuse den Testzeitraum (Abbildung 3.23).

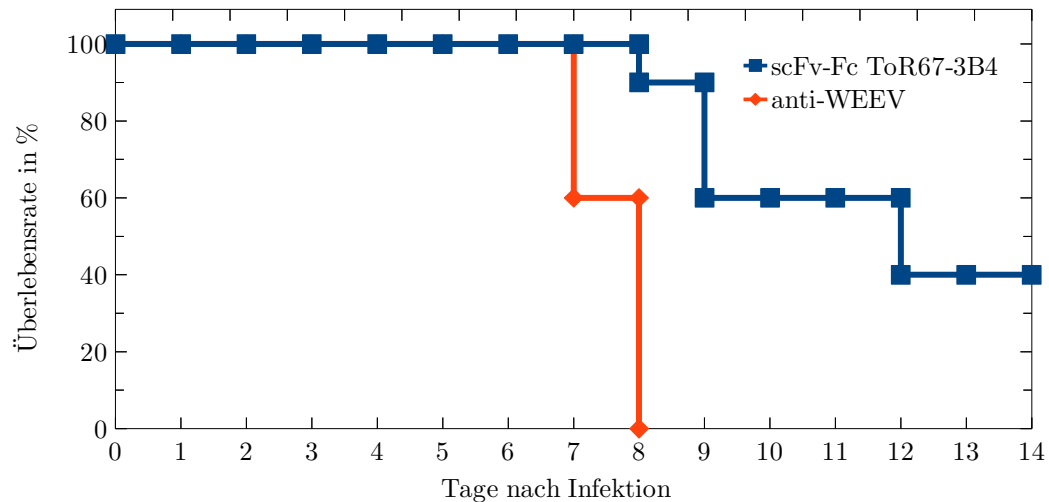


Abbildung 3.24: Überlebenskurve von mit BeAn8-Viren infizierten BALB/c-Mäusen – BALB/c-Mäuse wurden durch ein Aerosol mit etwa 100-fach LD₅₀ VEEV BeAn8 infiziert. Nach 6 Stunden erfolgte bei 6 Mäusen die intraperitoneale Injektion von 100 µg scFv-Fc ToR67-3B4, bei 10 Mäusen wurde eine intraperitoneale Injektion von 100 µg eines WEEV-spezifischen Antikörpers durchgeführt. (Daten: dstl)

Auch bei der Infektion von Mäusen mit dem Stamm BeAn8 des Subtyps IIIA konnte eine deutliche Erhöhung der Überlebensrate festgestellt werden. Alle mit Kontrollantikörper behandelte Mäuse starben bis zum Tag 8, bei Injektion des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 überlebten 40 % der infizierten Mäuse bis zum Tag 14 nach Infektion (Abbildung 3.24).

4

Diskussion

In dieser Arbeit wurden Immunantikörpergenbibliotheken gegen das Venezolanische Pferdeenzephalitis-Virus (VEEV) und das Westliche Pferdeenzephalitis-Virus (WEEV) generiert und aus diesen Bibliotheken spezifisch bindende Antikörper isoliert. Im Anschluss wurden die Antikörper auf ihre Eigenschaften hin charakterisiert.

Insbesondere bei Pathogenen wie Viren, für die eine Immunisierung von Organismen entweder nicht möglich oder ethisch nicht vertretbar ist, besitzt das in dieser Arbeit genutzte Phagen-Display einen immensen Vorteil. Die gesamte Selektion von spezifischen Antikörpern ist dabei in Prokaryoten nachgebildet. Die Selektion von virusspezifischen Antikörpern wurde bisher sowohl mit naiven Bibliotheken [106, 107], als auch mit Immunbibliotheken durchgeführt [108, 109]. Als Antigen wurden dabei meist rekombinante oder isolierte virale Proteine eingesetzt, welche in sehr reiner Form zur Selektion eingesetzt werden konnten [106, 110, 111]. Zur Isolierung spezifischer Antikörperfragmente wurden bisher zwei Experimente beschrieben, bei denen komplette, nicht umhüllte Pflanzenviren als Antigene genutzt wurden, wobei naive Antikörpergenbibliotheken auf das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern untersucht wurden [112, 113].

Vollständige Viruspartikel konnten noch nicht sehr häufig erfolgreich zur Isolation von virusspezifischen Antikörpern genutzt werden. Eine semi-synthetische

Antikörpergenbibliothek wurde von Van den Brink *et al.* zur Isolation von humanen scFvs genutzt, die spezifisch das Coronavirus SARS banden [114]. Des Weiteren wurde in Kirsch *et al.* beschrieben, dass aus einer naiven Antikörpergenbibliothek spezifische Antikörper gegen vollständige Viruspartikel isoliert werden konnten [82].

Aus Immunantikörpergenbibliotheken konnten häufiger erfolgreich Antikörper gegen vollständige Viruspartikel isoliert werden. Dies wurde dadurch ermöglicht, dass in Immunbibliotheken schon Antikörperfragmente vorhanden sind, welche die richtige Spezifität und eine hohe Affinität zu den Viruspartikel aufweisen [108, 109, 115, 116].

In dieser Arbeit sind insgesamt drei scFv-Immunantikörpergenbibliotheken generiert worden, die aus den Knochenmarkzellen immunisierter Makaken (*Macaca fascicularis*) erstellt wurden. Dadurch sollten affinitätsgereifte anti-VEEV und -WEEV Antikörper isoliert werden. Aufgrund der nahen Verwandtschaft zum Menschen sind Immunbibliotheken aus Primaten eine Quelle für nahezu humane Immunbibliotheken [78]. Während der verschiedenen Immunisierungszyklen wurden Serumproben der Makaken entnommen, und wurden auf das Vorhandensein von virusspezifischen Antikörpern untersucht. Diese Untersuchungen zeigten nach jeder Injektion von Viren einen Anstieg der virusspezifischen Antikörper und somit eine erfolgreiche Immunisierung bei allen immunisierten Makaken an. Bei der Generierung der Immunantikörpergenbibliothek wurde die V_H als zweite Sequenz nach der V_L in den pHAL14 Vektor kloniert, um damit die Diversität der V_H in der Immunbibliothek zu erhöhen. Da die V_H und die darin enthaltene sehr variable HCDR3 für die Diversität von Antikörpern eine größere Rolle zugeschrieben wird [25, 101], war die höhere Diversität der schweren Kette ein wichtiger Punkt, um Immunbibliotheken herzustellen, in der spezifische Antikörper gegen die genutzten Antigene vorhanden sind.

Die generierten Immunbibliotheken wiesen mit Diversitäten von $1,3 - 2,4 \cdot 10^7$ individuellen Klonen im Vergleich mit naiven scFv-Antikörpergenbibliotheken wie der HAL7/8 [79] mit etwa $5 \cdot 10^9$ individuellen Klonen eine relativ geringe Diversität auf. Jedoch sind die Chancen, aus einer Immunbibliothek affinitätsgereifte und spezifischere Antikörper zu isolieren, ungleich höher, da gegen

das zur Immunisierung genutzte Antigen eine große Anzahl von Antikörpern in den Immunbibliotheken vorhanden sein sollten. Insbesondere die genutzte Strategie zur Immunisierung der Makaken und die folgende Amplifikation der Antikörpergensequenzen wurde so gewählt, dass trotz dieser geringen Diversität hauptsächlich spezifische Antikörper gegen das Antigen vorhanden sein sollten [117].

Mittels Phagen-Display sollten spezifische Antikörper gegen VEE- und WEE-Viruspartikel aus den Immunbibliotheken selektiert werden. Für die Antikörperselektion wurde eine Strategie gewählt, die zuvor schon erfolgreich durchgeführt wurde [82]. Dadurch war es möglich, in den folgenden monoklonalen ELISA-Screenings aus 466 untersuchten scFvs insgesamt 70 Antikörper zu isolieren, die spezifisch an VEE- bzw. WEE-Viruspartikel banden. Aus der VEEV-Immunbibliothek konnte lediglich ein individueller scFv isoliert werden. Nach der Untersuchung von 322 individuellen Antikörpern aus der zweiten und dritten *Panning*-Runde und der darauf folgenden Sequenzierung von 24 VEEV-spezifischen Bindern wiesen alle Antikörper die gleiche DNA-Sequenz auf. Dies kann mit der Nutzung einer Immunbibliothek zum Teil erklärt werden, da eine Affinitätsreifung VEEV-spezifischer Antikörper im Makaken durch die Immunisierung gewünscht und erwartet war. Sollte diese Affinitätsreifung zu einem sehr spezifischen Binder geführt haben, wäre dieser Klon in der Immunbibliothek überrepräsentiert, also in einer deutlich höheren Anzahl vorhanden. Allerdings wurden, obwohl die Immunisierungen der Makaken mit WEEV analog durchgeführt wurde, aus den dadurch generierten Immunbibliotheken deutlich mehr individuelle WEEV-spezifische Antikörper isoliert. Aus der WEEV-Immunbibliothek wurden vier individuelle Antikörper isoliert, aus der WEEV nach VEEV-Immunbibliothek konnten trotz deutlich geringerer Untersuchungsmenge im ELISA-Screening zwei individuelle WEEV-spezifische Antikörper isoliert werden. Bei einer höheren Anzahl an untersuchten Klonen hätten wahrscheinlich noch bedeutend mehr Klone isoliert werden können. Allerdings sollten hochaffine und hochspezifische scFvs durch die Selektionsstrategie einen Vorteil gegenüber weiteren, weniger affinen und spezifischen scFvs besitzen. Daher sollten die individuell am besten bindenden scFvs auch schon

in einer geringen Anzahl von untersuchten Klonen vorhanden sein. Des Weiteren sind die Screenings zeit-, ressourcen- und kostenintensiv, so dass eine Vorauswahl getroffen werden und eine Begrenzung der untersuchten Klone durchgeführt werden musste.

Insbesondere für mögliche Therapieansätze im Menschen ist es von Vorteil, wenn Antikörper human oder human-ähnlich sind. Besonders die HAMA-Reaktion (*Human Anti Mouse Antibodies*) gegen monoklonale Mausantikörper, die durch die Hybridoma-Technologie generiert wurden, stellt eine Gefährdung der Patienten dar [118]. Aus diesem Grund wurden die isolierten NHP-Antikörper (NHP: *non-human primates*) mittels Sequenzanalyse untersucht. Der Vergleich der Aminosäuresequenz mit den am nächsten verwandten humanen Sequenzen der vier *Framework*-Bereiche wird als die Bestimmung des *Germinality Index* (durchgeführt nach [119]) bezeichnet, bei dem die für die isolierten Antikörper erhaltenen Werte zwischen 80 % und 92 % lagen. Die von den menschlichen Keimbahnlinien abweichenden Aminosäuresequenzen könnten in einer Therapie immunogen wirken, allerdings kann durch eine Sequenzanalyse keine abschließende Aussage darüber getroffen werden. Dadurch, dass das Material für die Immunbibliotheken aus nicht-humanen Primaten, also nahen Verwandten des Menschen, stammt, ist es eher wahrscheinlich, dass keine immunogene Wirkung auftreten würde. Im Falle einer solchen Wirkung könnten die Antikörper nachträglich humanisiert werden. Dazu müssten alle immunogen wirkenden Epitope entfernt werden, so dass die Aminosäuresequenz der Antikörper beim Einsatz als Therapeutikum nicht durch eine Immunreaktion unwirksam gemacht werden würde. Da bei den hier genutzten NHP-Antikörpern grundsätzlich aber schon eine sehr hohe Homologie zu humanen Antikörpern besteht, wären, wenn überhaupt, nur wenige Sequenzveränderungen nötig [119].

Für die weitere Charakterisierung wurden sämtliche isolierten scFvs in das scFv-Fc-Format konvertiert und in Mammalia-Zellen produziert. Das Fc-Fragment führt zu einer Dimerisierung, so dass ein IgG-ähnliches Molekül mit zwei Antigenbindestellen entsteht. Zusätzlich kann das Fc-Fragment zur Reinigung der Antikörper verwendet werden, indem eine Protein A- oder Antikörper-

basierte Chromatographie eingesetzt wird. Bei Bedarf wurden die vom WIS produzierten scFv-Fc-Antikörper chemisch biotinyliert. Das Fc-Fragment bietet dabei eine größere Anzahl potentieller Biotin-Bindestellen, wodurch die Funktion des scFvs nicht beeinträchtigt wird. Auch für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur *in vitro*- und *in vivo*-Neutralisation ist ein Fc-Fragment nötig, da es in den Zellen bzw. Versuchstieren die Immunreaktion durch Vermittlung von Effektorfunktionen beeinflussen kann. Die Produktion an der TU Braunschweig wurde in HEK293T-Zellen mittels transienter Transfektion in geringen Volumina durchgeführt. Nach der Reinigung mittels Protein A-Chromatographie wurde die Konzentration der scFv-Fc-Antikörper bestimmt. Im in dieser Arbeit beschriebenen Experiment wurden Konzentrationen von 10,4 bis 185,4 $\mu\text{g/mL}$ erhalten. Die Unterschiede in den Konzentrationen könnten mit einer Variabilität in der Transfektionseffizienz, die nicht untersucht wurde, erklärt werden. Außerdem können auch die variablen Antikörpersequenzen zu einem drastischen Unterschied in der Produktion führen.

Um die konzentrationsabhängigen Eigenschaften des VEEV-spezifischen scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 zu untersuchen, wurde ein Titrations-ELISA durchgeführt. Dabei wurden drei Konzentrationen des Antikörpers eingesetzt und die Virusmenge wurde titriert. Mit allen eingesetzten Antikörperkonzentrationen wurden identische Absorptionswerte erhalten, was auf eine Limitierung des Antigens hindeutet. Offensichtlich war die Konzentration der Antikörper so hoch, dass jede vorhandene Bindestelle durch einen Antikörper gebunden werden konnte. Daraus folgt, dass bei den eingesetzten Virusmengen eine absolute Antikörpermenge von 20 ng je Kavität ausreichend für die weiteren Tests wäre. Trotz dieses Ergebnisses wurde entschieden, bei folgenden ELISAs eine absolute Menge von 100 ng je Kavität einzusetzen, um in jedem Fall ein maximales Absorptionssignal zu erhalten. Durch eine weitere Titration mit deutlich geringeren Konzentrationen des Antikörpers sollten weitere Aussagen zu der Bindungseigenschaft des Antikörpers möglich sein, allerdings wurden dazu bisher keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 wurde dieser als Fänger- sowie als Detektionsantikörper für verschiedene Ver-

treter des VEEV-Komplexes und auch für weitere Alphaviren eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass eine Detektion nicht nur auf Viren des Subtyps IAB (attenuierter Impfstamm TC83) beschränkt war, der zur Immunisierung genutzt wurde, sondern eine breite Spezifität für die Subtypen des gesamten VEEV Komplex bestand. Mittels direktem ELISA auf gereinigten Viren wurden die Ergebnisse am dstl (Porton Down, England) verifiziert und weitere Subtypen getestet. Zusätzlich zum VEEV-Komplex wurde EEEV, ein taxonomisch näherer Verwandter des VEE-Komplexes als SFV und WEEV, spezifisch nachgewiesen [34,120]. Als Fängerantikörper eingesetzt war ebenfalls der Nachweis von VEEV TC83 möglich, allerdings wurde eine deutlich erhöhte Kreuzreaktivität festgestellt. Neben der erwarteten Spezifität für EEEV wurden auch CHIKV und SFV gebunden, obwohl beide zur SFV-Gruppe der Alphaviren gehören und als taxonomisch deutlich weiter entfernte Verwandte gelten. Außerdem wurde bei der Kontrolle des Alphavirus-spezifischen mAK Mix gezeigt, dass der Nachweis von Sindbis-Viren nicht durchgeführt werden konnte, was eine Aussage über die Spezifität des scFv-Fc-Antikörpers für SINV unmöglich macht. Daher wäre für diese Experimente ein Nachweis mit einem für das jeweilige Virus spezifischen monoklonalen Antikörper die bessere Wahl und würde zu genaueren Ergebnissen führen. In bisherigen Studien wurde bei VEEV-spezifischen Antikörpern ebenfalls die Spezifität für weitere Alphaviren untersucht. Beispielsweise zeigt der Antikörper 1A3B-7 [42] eine breite Spezifität für alle Serogruppen der VEE-Viren [86], weitere Alphaviren wurden nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Spezifität des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 über die VEEV-Gruppe der Alphaviren hinaus geht. Außerdem konnte mit der Bestimmung der Nachweisgrenze mittels direktem ELISA gezeigt werden, dass eine absolute Menge von $3,1 \cdot 10^6$ TCID₅₀/mL ausreicht, um einen spezifischen Nachweis zu ermöglichen. In früheren Untersuchungen wurden die Nachweisgrenzen durch anders aufgebaute Experimente bestimmt. Beispielsweise führten Dai *et al.* [121,122] einen ECL-Immunassay zur Bestimmung der Nachweisgrenze durch. Dabei wurde eine Nachweisgrenze von 10^3 pfu/mL erreicht. Da die Durchführung mit chemisch biotinylierten und Ruthenium-markierten Antikörpern erfolgte, konnte von einem mindestens um eine log-Stufe verbesserten Nachweis als in entspre-

chenden ELISA-Experimenten ausgegangen werden. In ELISA-Untersuchungen von Greiser-Wilke *et al.* [97] wurden zur Nachweisgrenze von unterschiedlichen Alphaviren Werte von $2,5 \cdot 10^3 - 1,3 \cdot 10^6$ TCID₅₀/mL erreicht. Speziell für die Nachweisgrenze von Viren des VEE-Komplexes erhaltene Werte lagen bei $6,3 \cdot 10^4 - 7,9 \cdot 10^5$ TCID₅₀/mL. Dies zeigt, dass der scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 zum Nachweis eingesetzt werden kann, die Sensitivität allerdings im Vergleich um etwa eine log-Stufe geringer ist. Ein Vergleich von unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern mit dem scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 in parallel durchgeführten Experimenten würde eine genauere Einordnung der Nachweisgrenze ermöglichen.

Zur Identifizierung des viralen Antigens des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 wurden Immunblot-Analysen unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Der scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 bindet unter nicht-reduzierenden Bedingungen spezifisch an das E1-Glycoprotein [104]. Unter reduzierenden Bedingungen wurde keine Bindung nachgewiesen, wodurch die Bindung an ein lineares Epitop ausgeschlossen werden kann. scFv-Fc ToR67-3B4 bindet demnach ein konformationelles Epitop des E1-Glycoproteins. Aufgrund dieses Resultats können die Ergebnisse bei den ELISAs zur Kreuzreaktion mit anderen Alphavirusstämmen ebenfalls neu interpretiert werden. E1 ist laut diverser Studien bei den Alphaviren weitaus konservierter als E2, so dass die Sequenzhomologien im E1-Glycoprotein zu der breiten Spezifität von ToR67-3B4 führen könnten [39, 123]. Aufgrund der Tatsache, dass die genaue Aminosäuresequenz des Epitops nicht genau bestimmt werden konnte, da es sich um ein konformationelles Epitop handelt, kann dies jedoch nur als Vermutung geäußert werden. Eine Möglichkeit zur Bestimmung des Epitops wäre die Durchführung von kompetitiven ELISA-Studien mit monoklonalen Antikörpern, deren Epitop bekannt ist. Dies wurde bereits von Hunt *et al.* mit VEEV-spezifischen Fab-Fragmenten gezeigt und könnte im Idealfall zur Identifizierung des Epitops des scFv-Fc-Antikörpers führen [123].

In immunhistochemischen Experimenten wurde untersucht, ob ein Nachweis von Viren in infizierten Zellen möglich ist. Dazu wurde der biotinylierte scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 eingesetzt, um eine VEEV-Infektion von Vero-Zel-

len nachzuweisen. Dabei konnte für die Virusstämme TrD und TC83 gezeigt werden, dass der Nachweis dieser Viren in lebenden Vero-Zellen möglich ist. Der als Positivkontrolle eingesetzte biotinylierte mAK SFV 8/6 [97, 103] zeigte eine sehr ähnliche Färbung bei infizierten Zellen, daher kann von einem effektiven Nachweis der Infektion ausgegangen werden.

Zur Charakterisierung der WEEV-spezifischen Antikörper wurden diese in Sandwich-ELISAs untersucht. Die scFv-Fc-Antikörper wurden jeweils als Fänger- und Detektionantikörper eingesetzt, um die unterschiedlichen Eigenschaften, die ebenfalls schon beim VEEV-spezifischen scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 festgestellt wurden, zu untersuchen. Bei den Experimenten wurde festgestellt, dass für jeden Antikörper eine genau definierte Konzentration eingesetzt werden muss, da die Detektion ansonsten entweder zu schwach oder unspezifisch ausfallen kann. Dabei könnte die unspezifische Bindung auf das genutzte scFv-Fc Format zurückzuführen sein, da bekannt ist, dass scFvs in hohen Konzentrationen zur Bildung von Dimeren und Multimeren tendieren [10]. Die dabei entstehenden Antikörperaggregate könnten eine unspezifische Bindung aufweisen und nach intensivem Waschen der ELISA-Platten noch vorhanden sein. Dadurch würde die Hintergrundfärbung drastisch erhöht werden.

Die in dieser Arbeit gezeigten Experimente geben einen Hinweis darauf, dass der scFv-Fc-Antikörper ToR68-2C3 sehr gut als Fängerantikörper geeignet wäre, da in diesem Sandwich-ELISA nahezu keine unspezifische Reaktion bis zu einer hohen Nachweisantikörperkonzentration zu detektieren war. Als Detektionsantikörper könnte der scFv-Fc-Antikörper ToR68-2E9 eingesetzt werden, da auch in diesem Experiment kaum unspezifische Reaktionen nachzuweisen waren. Basierend auf allen Experimenten, die in diesem Zusammenhang durchgeführt wurden, kann aus den sechs WEEV-spezifischen Antikörpern aus den zwei Immunbibliotheken in weiteren Experimenten ein Paar von Antikörpern ausgewählt werden, um einen sehr spezifischen und sensitiven Nachweis für WEE-Viren zu entwickeln. Da für den Nachweis von WEEV bisher kaum Methoden beschrieben wurden, könnte durch die Antikörper aus dieser Arbeit die Detektion von WEEV verbessert werden. Ein kommerzielles System für den Nachweis von WEEV mittels RT-PCR ist aktuell erhältlich (VetPCR WEEV

Detection Kit, BioinGentech, Chile), allerdings wäre ein Nachweis mittels ELISA wahrscheinlich einfacher, kostengünstiger und schneller durchzuführen.

Auch für die WEEV-spezifischen Antikörper wurden Experimenten zum immunhistochemischen Nachweis infizierter Zellen durchgeführt. Diese scFv-Fc-Antikörper waren ebenfalls für den Nachweis einer Infektion von Vero-Zellen geeignet. In diesem Experiment wurden die Zellen nicht in Mikrotiterplatten, sondern auf Glasobjektträgern fixiert. Dadurch wurde eine deutlich verbesserte Färbung des Virusantigens erreicht. Diese Art der Fixierung scheint für den immunhistochemischen Nachweis von infizierten Zellen besser geeignet zu sein. Möglicherweise kann durch die Verwendung eines Glasobjektträgers bei einer mikroskopischen Untersuchung eine bessere Bildgebung erreicht werden, als bei der Nutzung einer Mikrotiterplatte. Außerdem können zurückbleibende Mengen an Reagenzien auf den Glasoberflächen vermieden werden, was bei MTPs nicht ohne Weiteres gewährleistet ist und so zu Farbreaktionen führt, die durch Rückstände der HRP-Konjugate ausgelöst werden.

Für zusätzliche Experimente zur Charakterisierung des VEEV-spezifischen scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 konnte mit dem dstl ein weiterer Partner gewonnen werden. Dadurch konnten weitere Experimente zur *in vitro*- und *in vivo*-Neutralisation durchgeführt werden. Leider wurde bisher kein weiterer Kooperationspartner für Experimente mit den WEEV-spezifischen Antikörpern gefunden, so dass die neutralisierenden Eigenschaften dieser Antikörper bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht vorlagen.

Zur Bestimmung der neutralisierenden bzw. protektiven Aktivität des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 wurde untersucht, ob der Antikörper in Kulturen von Vero-Zellen die Infektion mit unterschiedlichen Virus-Subtypen inhibieren kann. Außerdem wurden mittels *Plaque Assay* erhaltene Ergebnisse zur neutralisierenden Wirkung des Antikörpers mit einbezogen. Zusammenfassend wurde dabei gezeigt, dass mit diesem scFv-Fc-Antikörper ein E1-spezifischer Antikörper mit neutralisierender Wirkung isoliert wurde. Mit Virusstämmen der Subtypen IAB (TC83), IE (Mena II), II (Fe37c) und dem Mucambo-Virus (BeAn8, früher Subtyp IIIA) infizierte Zellen wiesen in diesen Untersuchungen deutlich verringerte Mengen (unter 50 %) an Virusantigen bzw. Plaques

auf, so dass von einer neutralisierenden Wirkung ausgegangen werden konnte. Im *Plaque Assay* wurde zusätzlich zur Verringerung der Anzahl der Plaques eine Reduktion der Größe der verbliebenen Plaques beobachtet, auch dies ist ein Hinweis auf die neutralisierende Wirkung des Antikörpers. Als besonders interessant hervorzuheben ist die Tatsache, dass zwar der Impfstamm TC83 neutralisiert werden konnte, der Stamm TrD jedoch nicht. Da der Stamm TrD der Ausgangsstamm für den Impfstamm war [56], ist dieses Ergebnis sehr unerwartet. Beide Stämme sind dem Subtyp IAB zugeordnet und unterscheiden sich nur in einer einzigen Aminosäure im E1-Glycoprotein, welches als das virale Antigen des scFv-Fc-Antikörpers bestimmt wurde. Außerdem wurde im ELISA eine Bindung an TrD eindeutig nachgewiesen, was auf das Vorhandensein des viralen Antigens deutet. Da keine Neubestimmung der Aminosäuresequenz des E1-Glycoproteins durchgeführt wurde, kann eine genetische Modifikation in den Glycoproteinsequenzen nach der Passage und Produktion der Viren über Jahre nicht ausgeschlossen werden [124]. In früheren Arbeiten wurden diverse Antikörper isoliert, die spezifisch VEEV banden und ebenfalls neutralisierende Eigenschaften besaßen. Bei diesen Antikörpern wurde fast ausschließlich das E2-Glycoprotein als das virale Antigen bestimmt [87, 125–127]. In den Experimenten zur Neutralisation wurde festgestellt, dass die Effizienz der Neutralisation des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 deutlich geringer war als die Effizienz der Kontrollantikörper mAK SFV 8/6 und mAK 1A3B7. Dies kann zumindest zum Teil durch die Spezifität des scFv-Fc-Antikörpers für das E1-Glycoprotein erklärt werden und wird durch frühere Studien unterstützt. Hierbei wurde ebenfalls gezeigt, dass die Effizienz einer Neutralisation durch E2-spezifische Fabs und auch mAKs deutlich über der Effizienz von E1-spezifischen Antikörpern lag [104, 123, 128]. Jedoch zeigte der mAK SFV 8/6, der bei der Bestimmung des Antigens via Western-Blot mit anschließender Immunfärbung als E1-spezifisch bestätigt wurde, ebenfalls eine deutlich effizientere Neutralisation als der scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4. Dies könnte durch die Bindung an ein anderes Epitop zu erklären sein. Möglicherweise vermittelt die Bindung an das Epitop des mAKs SFV 8/6 eine bessere Neutralisation als eine Bindung an das Epitop des scFv-Fc-Antikörpers. Auch aus diesem Grund sollte durch einen kompetitiven ELISA bestimmt werden, an

welcher Stelle des E1 Glycoproteins der scFv-Fc-Antikörper im Vergleich mit anderen E1-spezifischen Antikörpern bindet [123].

Zur Bestimmung der Halbwertszeit des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 *in vivo* wurde drei BALB/c-Mäusen 100 μ g des Antikörpers injiziert und die Konzentration im Serum zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass nach fünf Tagen noch eine geringe Konzentration im Serum gezeigt werden konnte, nach 10 Tagen war dies nicht mehr der Fall. Dies könnte mit dem humanen Fc-Fragment erklärt werden, welches in der Maus eine Immunreaktion verursachen könnte. Dadurch würden die Antikörper schnell durch das Immunsystem der Maus markiert und im Folgenden abgebaut werden. Trotz der kurzen Zeitspanne, in der eine Bestimmung der Konzentration möglich war, konnte die Halbwertszeit auf 1,69 d bestimmt werden. Dieser Wert ist leicht geringer als die Werte bei zwei zuvor untersuchten Antikörpern, bei denen die Halbwertszeit auf 2 bzw. 5 bis 7 d bestimmt wurde [86,87]. Da diese Antikörper als vollständige IgGs untersucht wurden, kann die Größe für die erhöhte Halbwertszeit verantwortlich gewesen sein, da große Moleküle meist eine verlängerte Halbwertszeit aufweisen. Außerdem wurden in diesen Studien monoklonale Maus-Antikörper und humanisierte Antikörper untersucht, wobei bei Mausantikörpern des Typs IgG eine Halbwertszeit von bis zu 12 Tagen angenommen wird [129]. Im Fall des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 handelt es sich um einen scFv aus Makaken mit einem vollständig humanen Fc-Fragment. Diese Faktoren sind wahrscheinlich ausschlaggebend für die im Vergleich geringere Halbwertszeit bzw. Nachweisbarkeit im Mausserum.

Im Mausmodell wurden die Eigenschaften des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4 weiter analysiert. Dazu wurden Mäuse mit 100-fach LD₅₀ verschiedener Virustypen infiziert. Sechs bis 72 Stunden nach Infektion wurden intraperitoneal 100 μ g des Antikörpers ToR67-3B4 injiziert. Dabei wurde gezeigt, dass der Antikörper die Mäuse vor einer Infektion mit den VEE-Virus-Subtypen IAB, IE, II und IIIA schützen konnte, wenn der Antikörper 6 Stunden nach Infektion gegeben wurde. Bei einer Injektion des Antikörpers 24, 48 oder 72 Stunden nach Infektion wurden die Mäuse nicht geschützt und starben entsprechend der Kontrollgruppe an den Infektionen. Im Fall der Behandlung einer Infekti-

on mit TrD-Viren nach 48 h wurde eine Überlebensrate von 20 % festgestellt. Diese Mäuse zeigten keine phänomenologischen Anzeichen einer Infektion und könnten so die tatsächliche Sterberate verfälscht haben. Besonders interessant sind die Ergebnisse für den Stamm TrD, bei dem ebenfalls *in vivo* protektive Eigenschaften festgestellt werden konnten, obwohl der Antikörper *in vitro* die Infektion von Vero-Zellen nicht inhibieren konnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Schutz vor einer Infektion nicht notwendigerweise mit der Eigenschaft zur Neutralisation assoziiert werden muss. Bei einer Injektion der Antikörper nach 24 h hat die Infektion bereits stattgefunden, so dass der Antikörper nicht mehr protektiv ist. Dieses Ergebnis wird durch vorherige Studien unterstützt [85,91,125,127,130–132]. Insbesondere bei Phillpotts *et al.* werden unterschiedliche Experimente zur Neutralisation durchgeführt [91]. Dabei zeigt sich, dass die Neutralisation von Viren nicht zwangsläufig zum Schutz vor einer Infektion benötigt wird, wie auch schon bei Mathews *et al.* beschrieben wurde [130]. Mit dem monoklonalen Antikörper 1A3B-7, einem E2-spezifischen Antikörper, kann eine Neutralisation des Virus-Subtyps IC und ID in einer Mauszelllinie (L-929) gezeigt werden, nicht aber für den Subtypen IA/B. Im Gegensatz dazu ist der Schutz vor einem Virus des Subtyps IA/B *in vivo* durchaus vorhanden. Im Folgenden wird beschrieben, dass der genutzte IA/B Stamm eine Mutation im E2-Glycoprotein aufweist und deshalb die Neutralisation möglicherweise nicht gezeigt werden kann [57]. Jedoch konnte eindeutig gezeigt werden, dass im Falle von Subtyp II die Neutralisation in L-929-Zellen nicht vorhanden war, der Antikörper aber durchaus in der Lage war, bei einem *In Vivo*-Experiment das Überleben der Mäuse zu gewährleisten. Eine mögliche Wirkung des scFv-Fc-Antikörpers könnte demnach sein, dass dieser an die Viruspartikel bindet und sie so für das Immunsystem markiert. Der Antikörper könnte somit eine weitere Infektion von Zellen effektiv verhindern, ohne neutralisierende Eigenschaften zu besitzen. Ob in diesem Zusammenhang das Komplementsystem oder andere Effektorfunktionen benötigt werden, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Neben der Nutzung der in dieser Arbeit isolierten und charakterisierten Antikörper zur spezifischen Detektion und Identifikation von Alphaviren könnten

sie aufgrund ihres 'humanen' Aufbaus in der humanen antiviralen Therapie eingesetzt werden. Besonders dadurch, dass die scFvs aus Makaken isoliert und im Folgenden mit dem humanen Fc-Fragment fusioniert wurden, besitzen sie schon einen sehr human-ähnlichen Aufbau. Monoklonale Mausantikörper oder humanisierte Varianten können Einschränkungen in der Therapie, wie zum Beispiel das Fehlen von Effektorfunktionen oder einem schnellen Abbau, besitzen, bei den hier isolierten nahezu humanen Antikörpern ist dies wahrscheinlich nicht der Fall [86,87,125]. Sollten durch die Nutzung der NHP-scFvs für Menschen immunogene Epitope vorhanden sein, können diese durch die Humanisierung der entsprechenden Sequenzen entfernt werden. Das Fc-Fragment bleibt von dieser Einschränkung ausgenommen, da es vollständig human ist. Dadurch wäre der Aufwand einer notwendigen Humanisierung deutlich geringer als bei monoklonalen Antikörpern aus Mäusen oder auch chimären Antikörpern, denn nur in der scFv-Sequenz müssten potentiell immunogene Sequenzen ersetzt werden.

Der in dieser Arbeit isolierte VEEV-spezifische scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 ist das erste scFv-Fc Fusionsprotein, welches das virale E1-Glycoprotein bindet und *in vivo* eine deutliche protektive Wirkung gegen die Infektion mit diversen VEEV Subtypen aufweist. In folgenden Studien sollte der Einsatz als Therapeutikum bei Infektionen mit Alphaviren untersucht werden.

Abkürzungsverzeichnis

3880	Alphavirus, Subtyp ID
78V	Alphavirus, Subtyp IF
A	Ampicillin
A{ λ }	Absorption bei Wellenlänge { λ }
AG	Arbeitsgruppe
AG80	Alphavirus, Subtyp VI
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BeAn8	Alphavirus, Subtyp IIIA
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i> , Hamster-Nierenzelllinie
bla	β -Lactamase
bp	Basenpaare
BS	Braunschweig
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C _H	<i>constant heavy</i>
C _L	<i>constant light</i>
CaAr508	Alphavirus, Subtyp V
CDR	<i>complementarity determining regions</i>
cfu	<i>colony forming units</i>

CHIKV	Chikungunya Virus, Alphavirus, Subtyp IV
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> (Puffer)
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i> (Enzym)
d. h.	das heißt
Da	Dalton
dH ₂ O	Reinstwasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonikleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEEV	Östliches Pferdeenzephalitis-Virus
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
engl.	englisch
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
Fe37c	Alphavirus, Subtyp II
FR	<i>framework region</i>
Fv	<i>fragment variable</i>
<i>g</i>	Gravitationskonstante (9,81 m/s ²)
G	Glucose
GAH	<i>goat anti human</i>
HAL	<i>human antibody library</i> , <i>Hust antibody library</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i> , Zelllinie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase

Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KPCR	Kolonie-PCR
L929	Maus-Fibroblasten
lac	Lactose
log	logarithmisch (Basis 10)
Mena II	Alphavirus, Subtyp IE
MPBS	Milchpulver in PBS
MPBS-T	PBS mit Milchpulver (M) und Tween 20 (T)
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
MTP	Mikrotiterplatte
MW	<i>molecular weight</i> , Molekulargewicht
Neg.	Negativkontrolle
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
ORF	<i>open reading frame</i>
ORI	<i>origin of replication</i>
P676	Alphavirus, Subtyp IC
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-F	PBS mit FCS
pCMV	Plasmid mit Cytomegalovirus Promotor
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>phage dilution buffer</i>
pelB	Signalpeptidsequenz zum Transport des Proteins in das Periplasma

PIXV	Pixuna Virus, Alphavirus, Subtyp IV
PlacZ	Lac-Promotor
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
scFv	<i>single chain fragment variable</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFV	<i>Semliki Forest virus</i> , Alphavirus
SINV	Sibdbis Virus, Alphavirus
SOC	<i>super optimal broth with catabolic repression</i>
SV40	<i>simian virus 40</i> , Affenvirus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCID	<i>tissue culture infective dose</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TMB	Tetramethylbenzidin
TrD	<i>trinidad donkey</i> , Alphavirus, Subtyp IA/B
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
(v/v)	Volumen pro Volumen
VEEV	Venezuelanisches Pferdeenzephalitis-Virus
Vero-B4	Nierenzellen von Grünen Meerkatzen

V_H	<i>variable heavy</i> , variable Region der Schweren Kette
V_L	<i>variable light</i> , variable Region der Leichten Kette
(w/v)	Gewicht pro Volumen
WEEV	Westliches Pferdeenzephalitis-Virus
z. B.	Zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung von IgG-Antikörpern und rekombinanten Antikörperfragmenten	3
1.2	Der Bakteriophage M13	6
1.3	Antikörper-Phage und Phagemid-Vektor pHAL14	8
1.4	Generierung einer Antikörperbibliothek	10
1.5	Antikörperselektion (<i>Panning</i>)	12
1.6	VEEV-Partikel, mikroskopische Aufnahme und Schema	14
1.7	WEEV-Partikel, mikroskopische Aufnahme und Schema	15
2.1	Protein- und DNA-Längenstandards	28
3.1	ELISA mit den Makaken-Seren auf VEE-Viren	56
3.2	Schematische Darstellung des pHAL14 Phagemids	57
3.3	Monoklonaler ELISA mit isolierten scFvs aus dem <i>Panning</i> gegen VEEV	59
3.4	Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE	63
3.5	Western Blot und Immunfärbung nach SDS-PAGE	64
3.6	Titration-ELISA mit dem biotinylierten scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4	65
3.7	Sandwich-ELISA unterschiedlicher Alphavirus-Stämme mit scFv-Fc ToR67-3B4 als Detektionsantikörper	66

3.8	Sandwich-ELISA mit scFv-Fc ToR67-3B4 als Fängerantikörper und Nachweis mit unterschiedlichen mAKs	67
3.9	Direkter ELISA auf VEEV-Subtypen	68
3.10	Nachweisgrenze des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4	69
3.11	Bestimmung des viralen Antigens für den scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 mittels Western-Blot und Immunfärbung	70
3.12	Immunhistochemischer Nachweis von VEEV TrD-infizierten Zellen	71
3.13	WEEV Nachweis mit dem scFv-Fc-Antikörper ToR68-2C3 . . .	72
3.14	WEEV Nachweis mit dem scFv-Fc-Antikörper ToR68-2E9 . . .	73
3.15	Immunhistochemischer Nachweis von WEEV-infizierten Zellen .	74
3.16	Neutralisation von VEEV TC83 durch den scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4	75
3.17	Neutralisation von VEEV TrD durch den scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4	76
3.18	Neutralisation von VEEV Fe37c durch den scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4	77
3.19	Berechnung der in vivo Halbwertszeit des scFv-Fc-Antikörpers ToR67-3B4	79
3.20	Überlebenskurve von mit TrD-Viren infizierten BALB/c-Mäusen	80
3.21	Überlebenskurven von mit TrD-Viren infizierten BALB/c-Mäusen, Zeitreihe	81
3.22	Überlebenskurve von mit Mena II-Viren infizierten BALB/c-Mäusen	82
3.23	Überlebenskurve von mit Fe37c-Viren infizierten BALB/c-Mäusen	82
3.24	Überlebenskurve von mit BeAn8-Viren infizierten BALB/c-Mäusen	83

A.1	ELISA mit Makaken-Immunseren auf Vero-Zellkulturüberstand	130
A.2	Monoklonale ELISAs nach VEEV- <i>Panning</i> , Teil 1	131
A.3	Monoklonale ELISAs nach VEEV- <i>Panning</i> , Teil 2	132
A.4	Monoklonale ELISA nach WEEV- <i>Panning</i>	133
A.5	Einzelexperimente zum VEEV-Sandwich-ELISA	134

Tabellenverzeichnis

2.1	Geräte	17
2.2	Verbrauchsmaterialien	18
2.3	Chemikalien, Lösungen und Puffer	20
2.4	Medien und Lösungen für <i>E. coli</i>	23
2.5	Medien und Lösungen für Mammalia-Zellen	23
2.6	Bakterien, Säugerzelllinien und Bakteriophagen	24
2.7	Plasmide und Phagemide	24
2.8	Oligonukleotide	25
2.9	Enzyme und entsprechende Puffer	26
2.10	Kommerzielle Antikörper	26
2.11	Kit-Systeme	27
2.12	Software und Datenbanken	27
2.13	Ansatz und Temperaturprofil einer PCR-Reaktion	29
2.14	Ansatz und Temperaturprofil einer Kolonie-PCR-Reaktion	30
2.15	Zusammensetzung einer Restriktion	32
2.16	Ligationen	33
2.17	Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamid-Gels	43
3.1	Subbibliotheken	57

3.2	Diversität der Immunbibliotheken	58
3.3	Ergebnisse der Antikörperselektion	60
3.4	Bioinformatische Analyse mittels VBASE2 und <i>Germinality Index</i>	61
3.5	Konzentrationsbestimmung mittels <i>Human Antibody Capture</i> ELISA	62
3.6	Konzentrationsbestimmung des scFv-Fc-Antikörpers ToR67- 3B4 im Mausserum	78

Literatur

- [1] Janeway, C., Murphy, K., Travers, P. und Walport, M., *Janeway Immunobiology*, Garland Science, New York (2008)
- [2] Davies, D. R. und Metzger, H., *Structural Basis of Antibody Function*, Annu. Rev. Immunol. **1**, 87–115 (1983)
- [3] Dübel, S., Rohrbach, P. und Schmiedl, A., *Rekombinante Antikörper*, Biol. unserer Zeit **34**, 372–379 (2004)
- [4] Liddell, E., *Antikörper-Techniken*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford (1996)
- [5] Porter, R. R., *Structural Studies of Immunoglobulins*, Scand. J. Immunol. **34**, 382–388 (1991)
- [6] Beckman, R. A., Weiner, L. M. und Davis, H. M., *Antibody constructs in cancer therapy*, Cancer **109**, 170–179 (2007)
- [7] Bird, R., Hardman, K., Jacobson, J., Johnson, S., Kaufman, B., Lee, S., Lee, T., Pope, S., Riordan, G. und Whitlow, M., *Single-chain antigen-binding proteins*, Science **242**, 423–426 (1988)
- [8] Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M. S., Novotný, J., Margolies, M. N., Ridge, R. J., Brucoleri, R. E., Haber, E. und Crea, R., *Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. **85**, 5879–5883 (1988)

- [9] Schmiedl, A., Breitling, F., Winter, C. H., Queitsch, I. und Dübel, S., *Effects of unpaired cysteines on yield, solubility and activity of different recombinant antibody constructs expressed in E. coli*, J. Immunol. Methods **242**, 101–114 (2000)
- [10] Wörn, A. und Plückthun, A., *Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments*, J. Mol. Biol. **305**, 989–1010 (2001)
- [11] Skerra, A. und Plückthun, A., *Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli*, Science **240**, 1038–1041 (1988)
- [12] Schirrmann, T., Al-Halabi, L., Dübel, S. und Hust, M., *Production systems for recombinant antibodies*, Frontiers in Bioscience **13**, 4576–4594 (2008)
- [13] Köhler, G. und Milstein, C., *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*, Nature **256**, 495–497 (1975)
- [14] Smith, G., *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*, Science **228**, 1315–1317 (1985)
- [15] Barbas III, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K. und Silverman, G. J., *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)
- [16] Wang, Y. A., Yu, X., Overman, S., Tsuboi, M., Jr, G. J. T. und Egelman, E. H., *The Structure of a Filamentous Bacteriophage*, J. Mol. Biol. **361**, 209–215 (2006)
- [17] O’Brien, P. und Aitken, R., Hg., *Antibody Phage Display*, Humana Press, Totowa, New Jersey (2002)
- [18] Sambrook, J. und Russell, D., *Molecular cloning; a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 3. Aufl. (2001)
- [19] Breitling, F., Dübel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I. und Little, M., *A surface expression vector for antibody screening*, Gene **104**, 147–53 (1991)

- [20] McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. und Chiswell, D. J., *Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains*, Nature **348**, 552–554 (1990)
- [21] Barbas III, C. F., Kang, A. S., Lerner, R. A. und Benkovic, S. J., *Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site*, Proc. Natl. Acad. Sci. **88**, 7978–7982 (1991)
- [22] Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P. und Winter, G., *Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains*, Nucleic Acids Res. **19**, 4133–4137 (1991)
- [23] Hust, M. und Dübel, S., *Mating antibody phage display with proteomics*, Trends in Biotechnology **22**, 8–14 (2004)
- [24] Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D. und Winter, G., *By-passing immunization: Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage*, J. Mol. Biol. **222**, 581–597 (1991)
- [25] Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann, R. E., Jones, P. T., Low, N. M. und Allison, T. J., *Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires*, EMBO J. **13**, 3245–3260 (1994)
- [26] Thie, H., Voedisch, B., Dübel, S., Hust, M. und Schirrmann, T., *Affinity Maturation by Phage Display*, Meth. Mol. Biol. **525**, 309–322 (2009)
- [27] Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A. und Virnekäs, B., *Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides*, J. Mol. Biol. **296**, 57–86 (2000)

- [28] Hayashi, N., Welschof, M., Zewe, M., Braunagel, M., Dübel, S., Breitling, F. und Little, M., *Simultaneous mutagenesis of antibody CDR regions by overlap extension and PCR*, Biotechniques **17**, 310–315 (1994)
- [29] Parmley, S. F. und Smith, G. P., *Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes*, Gene **73**, 305–318 (1988)
- [30] Hust, M., Maiss, E., Jacobsen, H.-J. und Reinard, T., *The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease*, J. Virol. Methods **106**, 225–233 (2002)
- [31] Hawkins, R. E., Russell, S. J. und Winter, G., *Selection of phage antibodies by binding affinity: Mimicking affinity maturation*, J. Mol. Biol. **226**, 889–896 (1992)
- [32] Vieira, J. und Messing, J., *Production of single-stranded plasmid DNA*, Methods in Enzymology **153**, 3–11 (1987)
- [33] Rondot, S., Koch, J., Breitling, F. und Dübel, S., *A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display*, Nature Biotechnology **19**, 75–78 (2001)
- [34] Luers, A. J., Adams, S. D., Smalley, J. V. und Campanella, J. J., *A phylogenomic study of the genus Alphavirus employing whole genome comparison*, Comp. Funct. Genom. **6**, 217–227 (2005)
- [35] Johnston, E., R., und Peters, C. J., *Virology*, Lippincott-Raven, New York, 3 Aufl. (1996)
- [36] Griffin, D., *Alphaviruses*, Fields' Virology, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, 5 Aufl. (2004)
- [37] Strauss, J. H. und Strauss, E. G., *The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution.*, Microbiol Rev. **58**, 491–562 (1994)
- [38] Dalrymple, J. M., Schlesinger, S. und Russell, P. K., *Antigenic characterization of two Sindbis envelope glycoproteins separated by isoelectric focusing*, Virology **69**, 93–103 (1976)

- [39] Powers, A., Brault, A., Shirako, Y., Strauss, E., Kang, W., Strauss, J. und Weaver, S., *Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses*, J Virol. **75**, 10 118–10 131 (2001)
- [40] Pedersen, C. E. J. und Eddy, G. A., *Separation, Isolation, and Immunological Studies of the Structural Proteins of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus*, J Virol. **14**, 740–744 (1974)
- [41] Kinney, R. M., Trent, D. W. und France, J. K., *Comparative Immunological and Biochemical Analyses of Viruses in the Venezuelan Equine Encephalitis Complex*, J. Gen. Virol. **64**, 135–147 (1983)
- [42] Roehrig, J. T. und Mathews, J. H., *The neutralization site on the E2 glycoprotein of Venezuelan equine encephalomyelitis (TC-83) virus is composed of multiple conformationally stable epitopes*, Virology **142**, 347–356 (1985)
- [43] Roehrig, J. T., Hunt, A. R., Kinney, R. M. und Mathews, J. H., *In vitro mechanisms of monoclonal antibody neutralization of alphaviruses*, Virology **165**, 66–73 (1988)
- [44] Paredes, A., Alwell-Warda, K., Weaver, S. C., Chiu, W. und Watowich, S. J., *Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus Structure and Its Divergence from Old World Alphaviruses*, J. Virol. **75**, 9532–9537 (2001)
- [45] Hawley, R. J. und (Eitzen Jr), E. M., *Biological weapons — a primer for microbiologists*, Annu. Rev. Microbiol. **55**, 235–253 (2001)
- [46] Beck, C. E. und Wyckoff, R. W. G., *Venezuelan Equine Encephalomyelitis*, Science **88**, 530 (1938)
- [47] Casals, J., Curnen, E. C. und Thomas, L., *Venezuelan Equine Encephalomyelitis in Man*, J. Exp. Med. **77**, 521–530 (1943)
- [48] Zhang, R., Hryc, C. F., Cong, Y., Liu, X., Jakana, J., Gorchakov, R., Baker, M. L., Weaver, S. C. und Chiu, W., *4.4 Å cryo-EM structure of an enveloped alphavirus Venezuelan equine encephalitis virus*, EMBO **30**, 3854–3863 (2011)

- [49] Powers, A. M., Oberste, M. S., Brault, A. C., Rico-Hesse, R., Schmunra, S. M., Smith, J. F., Kang, W., Sweeney, W. P. und Weaver, S. C., *Repeated emergence of epidemic/epizootic Venezuelan equine encephalitis from a single genotype of enzootic subtype ID virus*, J Virol. **71**, 6697–6705 (1997)
- [50] Rivas, F., Diaz, L., Cardenas, V., Daza, E., Bruzon, L., Alcala, A., De la Hoz, O., Caceres, F., Aristizabal, G., Martinez, J., Revelo, D., De la Hoz, F., Boshell, J., Camacho, T., Calderon, L., Olano, V., Villarreal, L., Roselli, D., Alvarez, G., Ludwig, G. und Tsai, T., *Epidemic Venezuelan equine encephalitis in La Guajira, Colombia, 1995*, J Infect Dis. **175**, 828–832 (1997)
- [51] Sanchez, J., Takafuji, E., Lednar, W., LeDuc, J., Macasaet, F., Mangiafico, J., Rosato, R., Driggers, D. und Haecker, J., *Venezuelan equine encephalomyelitis: report of an outbreak associated with jungle exposure*, Mil Med. **149**, 618–621 (1984)
- [52] Weaver, S. C., Salas, R., Rico-Hesse, R., Ludwig, G. V., Oberste, M. S., Boshell, J. und Tesh, R. B., *Re-emergence of epidemic Venezuelan equine encephalomyelitis in South America*, The Lancet **348**, 436–440 (1996)
- [53] Leitenberg, M., *Biological weapons in the twentieth century: a review and analysis*, Crit. Rev.Microbiol. **27**, 267–320 (2001)
- [54] Darling, Capt. R. G. und Woods, Lt. Col. J. B., Hg., *USAMRIID's Medical Management of Biological Casualties Handbook (Blue Book)*, U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID), Fort Detrick, Maryland, 5 Aufl. (2004), <http://www.usamriid.army.mil/education/bluebookpdf/USAMRIID%20Blue%20Book%205th%20Edition.pdf> (28.02.2012)
- [55] Reed, D. S., Lind, C. M., Sullivan, L. J., Pratt, W. D. und Parker, M. D., *Aerosol Infection of Cynomolgus Macaques with Enzootic Strains of Venezuelan Equine Encephalitis Viruses*, J. Infect. Dis. **189**, 1013–1017 (2004)

- [56] Berge, T. O., Banks, I. S. und Tigertt, W. D., *Attenuation of venezuelan equine encephalomyelitis virus by in vitro cultivation in guinea-pig heart cells*, Am. J. Epidemiol. **73**, 209–218 (1961)
- [57] Phillpotts, R., Jones, L. und Howard, S., *Monoclonal antibody protects mice against infection and disease when given either before or up to 24 h after airborne challenge with virulent Venezuelan equine encephalitis virus*, Vaccine **20**, 1497–1504 (2002)
- [58] Kinney, R. M., Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Sneider, J. M., Roehrig, J. T., Woodward, T. M. und Trent, D. W., *Attenuation of Venezuelan equine encephalitis virus strain TC-83 is encoded by the 5'-noncoding region and the E2 envelope glycoprotein.*, J. Virol. **67**, 1269–1277 (1993)
- [59] Sherman, M. B. und Weaver, S. C., *Structure of the Recombinant Alphavirus Western Equine Encephalitis Virus Revealed by Cryoelectron Microscopy*, J. Virol. **84**, 9775–9782 (2010)
- [60] Meyer, K. F., Haring, C. M. und Howitt, B., *The etiology of epizootic encephalomyelitis of horses in the San Joaquin Valley, 1930*, Science **74**, 227–228 (1931)
- [61] Reeves, W. C., *Epidemiology and Control of Mosquito-Borne Arboviruses in California, 1943–1987*, California Mosquito and Vector Control Association, Inc., Sacramento, CA (1990)
- [62] Wagstaff, K., Dickson, S. und Bailey, A., *Western equine encephalitis surveillance in Utah*, J Am Mosq Control Assoc. **2**, 201–203 (1986)
- [63] Howitt, B., *Recovery of the virus of equine encephalomyelitis from the braun of a child*, Science **88**, 455 (1938)
- [64] Calisher, C. H., *Medically important arboviruses of the United States and Canada.*, Clin. Microbiol. Rev. **7**, 89–116 (1994)
- [65] Hahn, C. S., Lustig, S., Strauss, E. G. und Strauss, J. H., *Western Equine Encephalitis Virus is a Recombinant Virus*, Proc. Natl. Acad. Sci. **85**, 5997–6001 (1988)

- [66] Sena-Esteves, M., Saeki, Y., Camp, S. M., Chiocca, E. A. und Breakefield, X. O., *Single-Step Conversion of Cells to Retrovirus Vector Producers with Herpes Simplex Virus–Epstein-Barr Virus Hybrid Amplicons*, J. Virol. **73**, 10 426–10 439 (1999)
- [67] <http://www.libreoffice.org> (01.03.2012)
- [68] Corpet, F., *Multiple sequence alignment with hierarchical clustering*, Nucleic Acids Res. **16**, 10 881–10 890 (1988)
- [69] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (01.03.2012)
- [70] Retter, I., Althaus, H. H., Münch, R. und Müller, W., *VBASE2, an integrative V gene database*, Nucleic Acids Res. **33**, D671–D674 (2005), <http://www.vbase2.org> (01.03.2012)
- [71] <http://www.latex-project.org> (01.03.2012)
- [72] <http://www.gimp.org> (01.03.2012)
- [73] <http://inkscape.org> (01.03.2012)
- [74] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*, Cold Spring Harb Symp Quant Biol. **51**, 263–273 (1986)
- [75] Pelat, T., Hust, M., Hale, M., Lefranc, M.-P., Dübel, S. und Thullier, P., *Isolation of a human-like antibody fragment (scFv) that neutralizes ricin biological activity*, BMC Biotechnology **9**, 60 (2009)
- [76] Pelat, T., Hust, M., Laffly, E., Condemine, F., Bottex, C., Vidal, D., Lefranc, M.-P., Dübel, S. und Thullier, P., *High-Affinity, Human Antibody-Like Antibody Fragment (Single-Chain Variable Fragment) Neutralizing the Lethal Factor (LF) of Bacillus anthracis by Inhibiting Protective Antigen-LF Complex Formation*, Antimicrob. Agents Chemother. **51**, 2758–2764 (2007)

- [77] Schirrmann, T. und Hust, M., *Construction of Human Antibody Gene Libraries and Selection of Antibodies by Phage Display*, Meth. Mol. Biol. **651**, 177–209 (2010)
- [78] Schütte, M., Thullier, P., Pelat, T., Wezler, X., Rosenstock, P., Hinz, D., Kirsch, M. I., Hasenberg, M., Frank, R., Schirrmann, T., Gunzer, M., Hust, M. und Dübel, S., *Identification of a Putative Crf Splice Variant and Generation of Recombinant Antibodies for the Specific Detection of Aspergillus fumigatus*, PLoS ONE **4**, e6625 (2009)
- [79] Hust, M., Meyer, T., Voedisch, B., Rülker, T., Thie, H., El-Ghezal, A., Kirsch, M. I., Schütte, M., Helmsing, S., Meier, D., Schirrmann, T. und Dübel, S., *A human scFv antibody generation pipeline for proteome research*, J. Biotechnol. **152**, 159–170 (2011)
- [80] Hust, M., Dübel, S. und Schirrmann, T., *Selection of Recombinant Antibodies From Antibody Gene Libraries*, in Ochs, M. F., Hg., *Gene Function Analysis*, Bd. 408 von *Methods in Molecular Biology*, 243–255, Humana Press (2007)
- [81] Goldsmith, M. E. und Konigsberg, W. H., *Adsorption protein of the bacteriophage fd: isolation, molecular properties, and location in the virus*, Biochemistry **16**, 2686–2694 (1977)
- [82] Kirsch, M. I., Hülseweh, B., Nacke, C., Rülker, T., Schirrmann, T., Marschall, H.-J., Hust, M. und Dübel, S., *Development of human antibody fragments using antibody phage display for the detection and diagnosis of Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV)*, BMC Biotechnology **8**, 66 (2008)
- [83] Henchal, E. A., Gentry, M. K., McCown, J. M. und Brandt, W. E., *Dengue Virus-Specific and Flavivirus Group Determinants Identified with Monoclonal Antibodies by Indirect Immunofluorescence*, J. Trop. Med. Hyg. **31**, 830–836 (1982)

- [84] Hust, M., Steinwand, M., Al-Halabi, L., Helmsing, S., Schirrmann, T. und Dübel, S., *Improved microtitre plate production of single chain Fv fragments in Escherichia coli*, New Biotechnology **25**, 424 – 428 (2009)
- [85] O'Brien, L. M., Underwood-Fowler, C. D., Goodchild, S. A., Phelps, A. L. und Phillpotts, R. J., *Development of a novel monoclonal antibody with reactivity to a wide range of Venezuelan equine encephalitis virus strains*, Virology **6**, 206 (2009)
- [86] Goodchild, S. A., O'Brien, L. M., Steven, J., Muller, M. R., Lanning, O. J., Logue, C. H., D'Elia, R. V., Phillpotts, R. J. und Perkins, S. D., *A humanised murine monoclonal antibody with broad serogroup specificity protects mice from challenge with Venezuelan equine encephalitis virus*, Antiviral Res. **90**, 1–8 (2011)
- [87] Hu, W.-G., Phelps, A. L., Jager, S., Chau, D., Hu, C. C., O'Brien, L. M., Perkins, S. D., Gates, A. J., Phillpotts, R. J. und Nagata, L. P., *A recombinant humanized monoclonal antibody completely protects mice against lethal challenge with Venezuelan equine encephalitis virus*, Vaccine **28**, 5558–5564 (2010)
- [88] Laemmli, U. K., *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*, Nature **227**, 680–685 (1970)
- [89] Hülseweh, B., Ehricht, R. und Marschall, H.-J., *A simple and rapid protein array based method for the simultaneous detection of biowarfare agents*, Proteomics **6**, 2972–2981 (2006)
- [90] Sagripanti, J.-L., Hülseweh, B., Grote, G., Voß, L., Böhling, K. und Marschall, H.-J., *Microbial Inactivation for Safe and Rapid Diagnostics of Infectious Samples*, Appl. Environ. Microbiol. **77**, 7289–7295 (2011)
- [91] Phillpotts, R., *Venezuelan equine encephalitis virus complex-specific monoclonal antibody provides broad protection, in murine models, against airborne challenge with viruses from serogroups I, II and III*, Virus Res. **120**, 107–112 (2006)

- [92] Spearman, C., *The method of 'Right and wrong cases' (Constant Stimuli') without Gauss's formulae*, Brit. J. Psychol., 1904-1920 **2**, 227–242 (1908)
- [93] Kärber, G., *Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche*, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology **162**, 480–483 (1931), 10.1007/BF01863914
- [94] Hamilton, M. A., Russo, R. C. und Thurston, R. V., *Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays*, Environ. Sci. Technol. **11**, 714–719 (1977)
- [95] Jensen, M., *Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhea virus in porcine serum. A comparative examination using CF, PLA and NPLA assays*, Acta Vet Scand. **22**, 85–98 (1981)
- [96] Hülseweh, B., *Persönliche Mitteilungen* (2009–2011)
- [97] Greiser-Wilke, I. M., Moennig, V., Kaaden, O. R. und Shope, R. E., *Detection of alphaviruses in a genus-specific antigen capture enzyme immunoassay using monoclonal antibodies.*, J.Clin. Microbiol. **29**, 131–137 (1991)
- [98] May, K., *The collison nebulizer: Description, performance and application*, J. Aerosol Sci. **4**, 235–243 (1973)
- [99] Henderson, D. W., *An Apparatus for the Study of Airborne Infection*, J. Hyg. **50**, 53–68 (1952)
- [100] Wright, A. J. und Phillpotts, R. J., *Humane endpoints are an objective measure of morbidity in Venezuelan encephalomyelitis virus infection of mice*, Arch. Virol. **143**, 1155–1162 (1998)
- [101] Shirai, H., Kidera, A. und Nakamura, H., *H3-rules: identification of CDR-H3 structures in antibodies*, FEBS Letters **455**, 188–197 (1999)
- [102] Mollova, S., Retter, I., Hust, M., Dübel, S. und Müller, W., *Analysis of Single Chain Antibody Sequences Using the VBASE2 Fab Analysis*

- Tool*, in Kontermann, R. und Dübel, S., Hg., *Antibody Engineering*, 3–10, Springer Berlin Heidelberg (2010)
- [103] Greiser-Wilke, I., Moennig, V., Kaaden, O.-R. und Figueiredo, L. T. M., *Most Alphaviruses Share a Conserved Epitopic Region on Their Nucleocapsid Protein*, J. Gen. Virol. **70**, 743–748 (1989)
- [104] Roehrig, J. T., Day, J. W. und Kinney, R. M., *Antigenic analysis of the surface glycoproteins of a Venezuelan equine encephalomyelitis virus (TC-83) using monoclonal antibodies*, Virology **118**, 269–278 (1982)
- [105] Roehrig, J. T. und Bolin, R. A., *Monoclonal antibodies capable of distinguishing epizootic from enzootic varieties of subtype 1 Venezuelan equine encephalitis viruses in a rapid indirect immunofluorescence assay.*, J. Clin. Microbiol. **35**, 1887–90 (1997)
- [106] Donà, M. G., Giorgi, C. und Accardi, L., *Characterization of antibodies in single-chain format against the E7 oncoprotein of the Human papillomavirus type 16 and their improvement by mutagenesis*, BMC Cancer **7**, 25 (2007)
- [107] Rodríguez-Díaz, J., Monedero, V., Pérez-Martínez, G. und Buesa, J., *Single-chain variable fragment (scFv) antibodies against rotavirus NSP4 enterotoxin generated by phage display*, J. Virol. Methods **121**, 231–238 (2004)
- [108] Duan, J., Ji, X., Feng, J., Han, W., Zhang, P., Cao, W., Guo, X., Qi, C., Yang, D., Jin, G., Gao, G. und Yan, X., *A human neutralizing antibody against a conformational epitope shared by oligomeric SARS S1 protein.*, Antivir. Ther. **11**, 1 (2006)
- [109] Koch, J., Liang, M., Queitsch, I., Kraus, A. A. und Bautz, E. K., *Human recombinant neutralizing antibodies against hantaan virus G2 protein*, Virology **308**, 64 – 73 (2003)
- [110] Park, S.-G., Jeong, Y.-J., Lee, Y.-Y., Kim, I.-J., Seo, S.-K., Kim, E.-J., Jung, H.-C., Pan, J.-G., Park, J.-G., Lee, Y.-J., Kim, I.-S. und Choi, I.-

- H., *Hepatitis B virus-neutralizing anti-pre-S1 human antibody fragments from large naïve antibody phage library*, *Antivir. Res.* **68**, 109–115 (2005)
- [111] Velappan, N., Martinez, J. S., Valero, R., Chasteen, L., Ponce, L., Bondu-Hawkins, V., Kelly, C., Pavlik, P., Hjelle, B. und Bradbury, A. R., *Selection and characterization of scFv antibodies against the Sin Nombre hantavirus nucleocapsid protein*, *J. Immunol. Methods* **321**, 60–69 (2007)
- [112] Griep, R., Prins, M., Twisk, C. v., Keller, H., Kerschbaumer, R., Kormelink, R., Goldbach, R. und Schots, A., *Application of phage display in selecting Tomato spotted wilt virus-specific single-chain antibodies (scFvs) for sensitive diagnosis in ELISA.*, *Phytopathology* **90**, 189–190 (2000)
- [113] Uhde, K., Kerschbaumer, R. J., Koenig, R., Hirschl, S., Lemaire, O., Boonham, N., Roake, W. und Himmler, G., *Improved detection of Beet necrotic yellow vein virus in a DAS ELISA by means of antibody single chain fragments (scFv) which were selected to protease-stable epitopes from phage display libraries*, *Arch. Virol.* **145**, 179–185 (2000), 10.1007/s007050050015
- [114] Van den Brink, E. N., Ter Meulen, J., Cox, F., Jongeneelen, M. A. C., Thijssen, A., Throsby, M., Marissen, W. E., Rood, P. M. L., Bakker, A. B. H., Gelderblom, H. R., Martina, B. E., Osterhaus, A. D. M. E., Preiser, W., Doerr, H. W., de Kruif, J. und Goudsmit, J., *Molecular and Biological Characterization of Human Monoclonal Antibodies Binding to the Spike and Nucleocapsid Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*, *J. Virol.* **79**, 1635–1644 (2005)
- [115] De Carvalho Nicacio, C., Williamson, R. A., Parren, P. W. H. I., Lundkvist, k., Burton, D. R. und Björling, E., *Neutralizing Human Fab Fragments against Measles Virus Recovered by Phage Display*, *J. Virol.* **76**, 251–258 (2002)
- [116] Kim, S. J., Jang, M. H., Stapleton, J. T., Yoon, S. O., Kim, K.-S., Jeon, E.-S. und Hong, H. J., *Neutralizing human monoclonal antibodies to*

- hepatitis A virus recovered by phage display*, *Virology* **318**, 598 – 607 (2004)
- [117] Pelat, T. und Thullier, P., *Non-human primate immune libraries combined with germline humanization - An (almost) new, and powerful approach for the isolation of therapeutic antibodies*, *MAbs* **1**, 377–381 (2009)
- [118] Klee, G. G., *Human Anti-Mouse Antibodies*, *Arch Pathol Lab Med* **124**, 921–923 (2000)
- [119] Pelat, T., Bedouelle, H., Rees, A. R., Crennell, S. J., Lefranc, M.-P. und Thullier, P., *Germline Humanization of a Non-human Primate Antibody that Neutralizes the Anthrax Toxin, by in Vitro and in Silico Engineering*, *J. Mol. Biol.* **384**, 1400–1407 (2008)
- [120] Kubes, V. und Ríos, F. A., *The causative agent of infectious equine encephalomyelitis in Venezuela*, *Science* **90**, 20–21 (1939)
- [121] Dai, X., Fulton, R., Hilsen, R., Hu, W. und Ratches, J., *Rapid and sensitive detection of Venezuelan equine encephalitis virus by electrochemiluminescence immunoassay*, *Defence R & D Canada – Suffield Technical Report* (2008)
- [122] Dai, X., Hilsen, R. E., Hu, W.-G. und Fulton, R. E., *Microbead electrochemiluminescence immunoassay for detection and identification of Venezuelan equine encephalitis virus*, *J. Virol. Methods.* **169**, 274–281 (2010)
- [123] Hunt, A. R., Frederickson, S., Maruyama, T., Roehrig, J. T. und Blair, C. D., *The First Human Epitope Map of the Alphaviral E1 and E2 Proteins Reveals a New E2 Epitope with Significant Virus Neutralizing Activity*, *PLoS Negl Trop Dis* **4**, e739 (2010)
- [124] McCurdy, K., Joyce, J., Hamilton, S., Nevins, C., Sosna, W., Puricelli, K. und Rayner, J. O., *Differential accumulation of genetic and phenotypic*

- changes in Venezuelan equine encephalitis virus and Japanese encephalitis virus following passage in vitro and in vivo*, Virology **415**, 20–29 (2011)
- [125] Hunt, A. R., Frederickson, S., Hinkel, C., Bowdish, K. S. und Roehrig, J. T., *A humanized murine monoclonal antibody protects mice either before or after challenge with virulent Venezuelan equine encephalomyelitis virus*, J. Gen. Virol. **87**, 2467–2476 (2006)
- [126] Hunt, A. R., Bowen, R. A., Frederickson, S., Maruyama, T., Roehrig, J. T. und Blair, C. D., *Treatment of mice with human monoclonal antibody 24 h after lethal aerosol challenge with virulent Venezuelan equine encephalitis virus prevents disease but not infection*, Virology **414**, 146–152 (2011)
- [127] Wust, C., Nicholas, J., Fredin, D., Dodd, D., Brideau, R., Lively, M. und Brown, A., *Monoclonal antibodies that cross-react with the E1 glycoprotein of different alphavirus serogroups: characterization including passive protection in vivo*, Virus Res. **13**, 101–112 (1989)
- [128] Phillpotts, R. und Wright, A., *TC-83 vaccine protects against airborne or subcutaneous challenge with heterologous mouse-virulent strains of Venezuelan equine encephalitis virus*, Vaccine **17**, 982–988 (1999)
- [129] Sigounas, G., Harindranath, N., Donadel, G. und Notkins, A. L., *Half-life of polyreactive antibodies*, J Clin Immunol **14**, 134–140 (1994)
- [130] Mathews, J. H., Roehrig, J. T. und Trent, D. W., *Role of complement and the Fc portion of immunoglobulin G in immunity to Venezuelan equine encephalomyelitis virus infection with glycoprotein-specific monoclonal antibodies.*, J. Virol. **55**, 594–600 (1985)
- [131] Wust, C., Crombie, R. und Brown, A., *Passive protection across subgroups of alphaviruses by hyperimmune non-cross-neutralizing anti-Sindbis serum*, Proc Soc Exp Biol Med **184**, 56–63 (1987)

- [132] Schmaljohn, A. L., Johnson, E. D., Dalrymple, J. M. und Cole, G. A., *Non-neutralizing monoclonal antibodies can prevent lethal alphavirus encephalitis*, Nature **297**, 70–72 (1982)

Veröffentlichungen

Rülker, T., Voß, L., Thullier, P., O' Brien, L.M., Pelat, T., Perkins, S.D., Langermann, C., Schirrmann, T., Dübel, S., Marschall, H.J., Hust, M. and Hülseweh, B. *Isolation and characterisation of a human-like antibody fragment (scFv) that inactivates VEEV in vitro and in vivo*. PLoS ONE (in revision)

Thullier, P., Hülseweh, B., Pelat, T., Rülker, T., Miethe, S., Dübel, S. and Hust, M. *Development of human and macaque antibodies using antibody phage display for the detection of equine encephalitis viruses*. In: Encephalitis / Book 3. Intech (in press)

Hust, M., Meyer, T., Voedisch, B., Rülker, T., Thie, H., El-Ghezal, A., Kirsch, M.I., Schütte, M., Helmsing, S., Meier, D., Schirrmann, T. and Dübel, S. *A human scFv antibody generation pipeline for proteome research*. Journal of Biotechnology 2011, **152**, 159-170

Rülker, T., Meier, D. and Schirrmann, T. *Quantification of human IgG and related Fc fusion proteins by a human IgG/Fc capture ELISA*. In: Antibody engineering Vol 1, Ed: Kontermann, R. and Dübel, S., Springer-Verlag, 2010, 743-748

Kirsch, M. I.; Hülseweh, B.; Nacke, C.; Rülker, T.; Schirrmann, T.; Marschall, H.-J.; Hust, M. and Dübel, S. *Development of human antibody fragments using antibody phage display for the detection and diagnosis of Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV)*. BMC Biotechnology, 2008, 8, 66

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dübel für die Möglichkeit zur Promotion und die stets kompetente wissenschaftliche Beratung.

Bei Herrn Prof. Dr. Bode bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Herrn Prof. Dr. Käufer danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Bei Herrn PD Dr. Michael Hust, Herrn Dr. Thomas Schirrmann und Herrn Dr. André Frenzel bedanke ich mich für die immer verfügbare, tolle Unterstützung, die sehr hilfreichen Diskussionen und Beiträge, sowie auch die Korrektur meiner Arbeit. Ihnen sowie auch allen weiteren Arbeitskollegen des Instituts für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik danke ich für eine großartige Arbeitsatmosphäre, das jederzeit freundschaftliche Verhalten und die Hilfe bei jeder wissenschaftlichen und technischen Frage.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Birgit Hülseweh und Frau Luzie Voss der Abteilung Virologie des Wehrwissenschaftlichen Instituts für Schutztechnologien (WIS) für die tolle Unterstützung, die Durchführung der Experimente im S3 Labor und die großzügige Bereitstellung von Virusmaterial und Antikörpern. Weiter danke ich Dr. Perkins, Dr. O'Brien und Dr. Goodchild vom *Defense Science & Technology Laboratory* (dstl) für ihre Unterstützung bei meinen Experimenten und besonders für die Durchführung der Mausexperimente.

Ein riesiger Dank gebührt meinem guten Freund Dr. Ali Awada für die jederzeit vorhandene Unterstützung bei allen Fragen rund um L^AT_EX und alle damit verbundenen Programme und auch für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt schließlich meiner Familie und meinen Freunden für ihr Vertrauen, Interesse und die stets liebevolle Unterstützung. Insbesondere danke ich meinen lieben Eltern, die mir jederzeit hilfreich zur Seite standen. Ohne euch wäre dies alles nicht möglich gewesen.

A

Anhang

A.1 ELISA mit Makaken-Seren auf Vero-Zellkulturüberstand

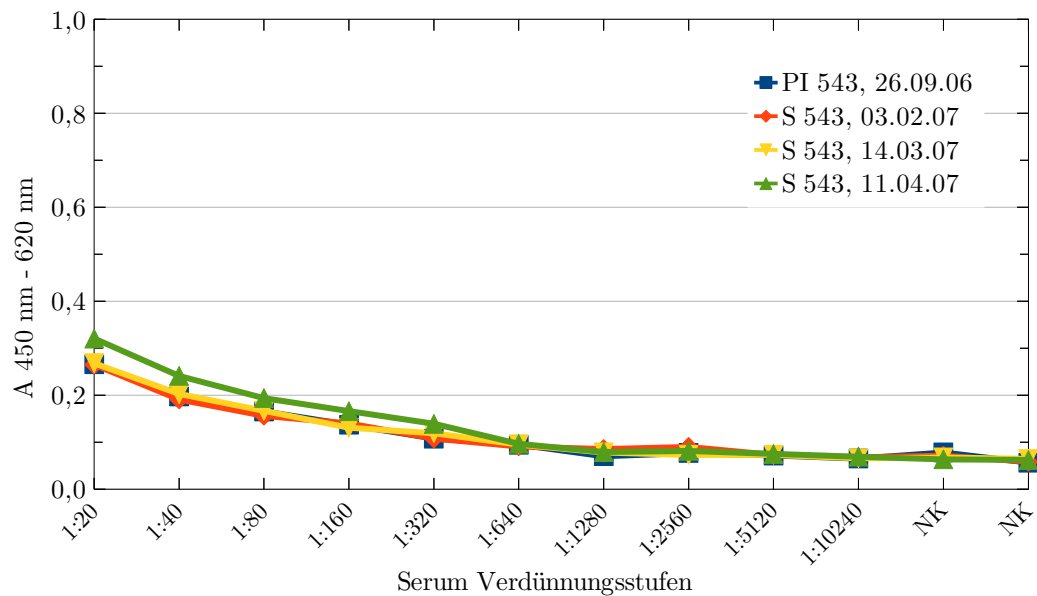


Abbildung A.1: ELISA mit Makaken-Immunsereen auf Vero-Zellkulturüberstand – Negativkontrolle zum ELISA mit Makaken-Seren. Statt gereinigter Viren wurde gereinigter Zellkulturüberstand nicht infizierter Vero-Zellen genutzt.

A.2 Monoklonale ELISAs nach den *Pannings*

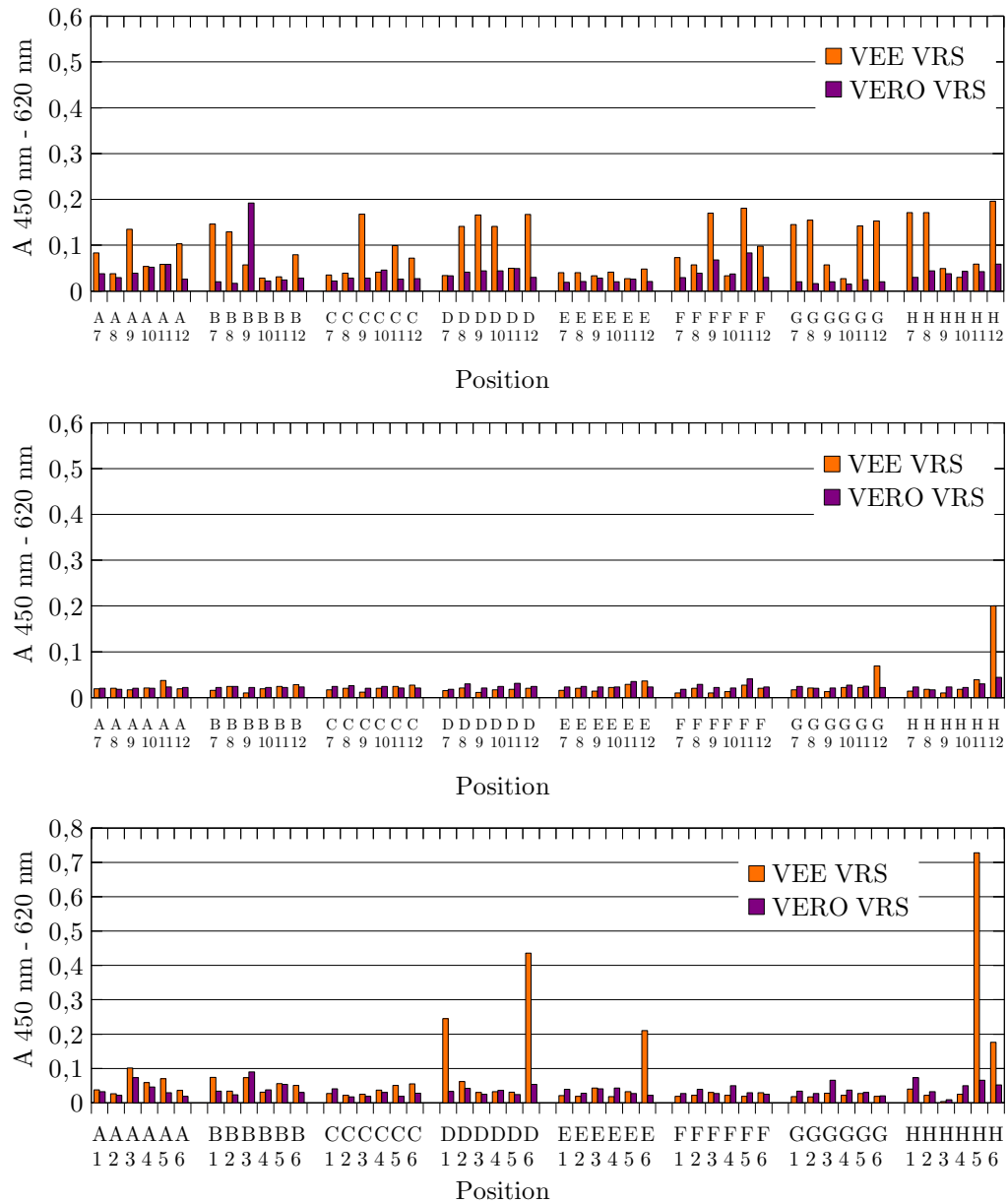


Abbildung A.2: Monoklonale ELISAs nach VEEV-*Panning*, Teil 1 –
Oben: VEEV *Panning*, Runde 3, MTP 1, Spalten 7-12 der isolierten Klone,
Mitte: VEEV *Panning*, Runde 2, MTP 1, Spalten 7-12 der isolierten Klone,
Unten: VEEV *Panning*, Runde 2, MTP 2, Spalten 1-6 der isolierten Klone,
 Negativkontrolle H3/H9, Positivkontrolle H6/H12

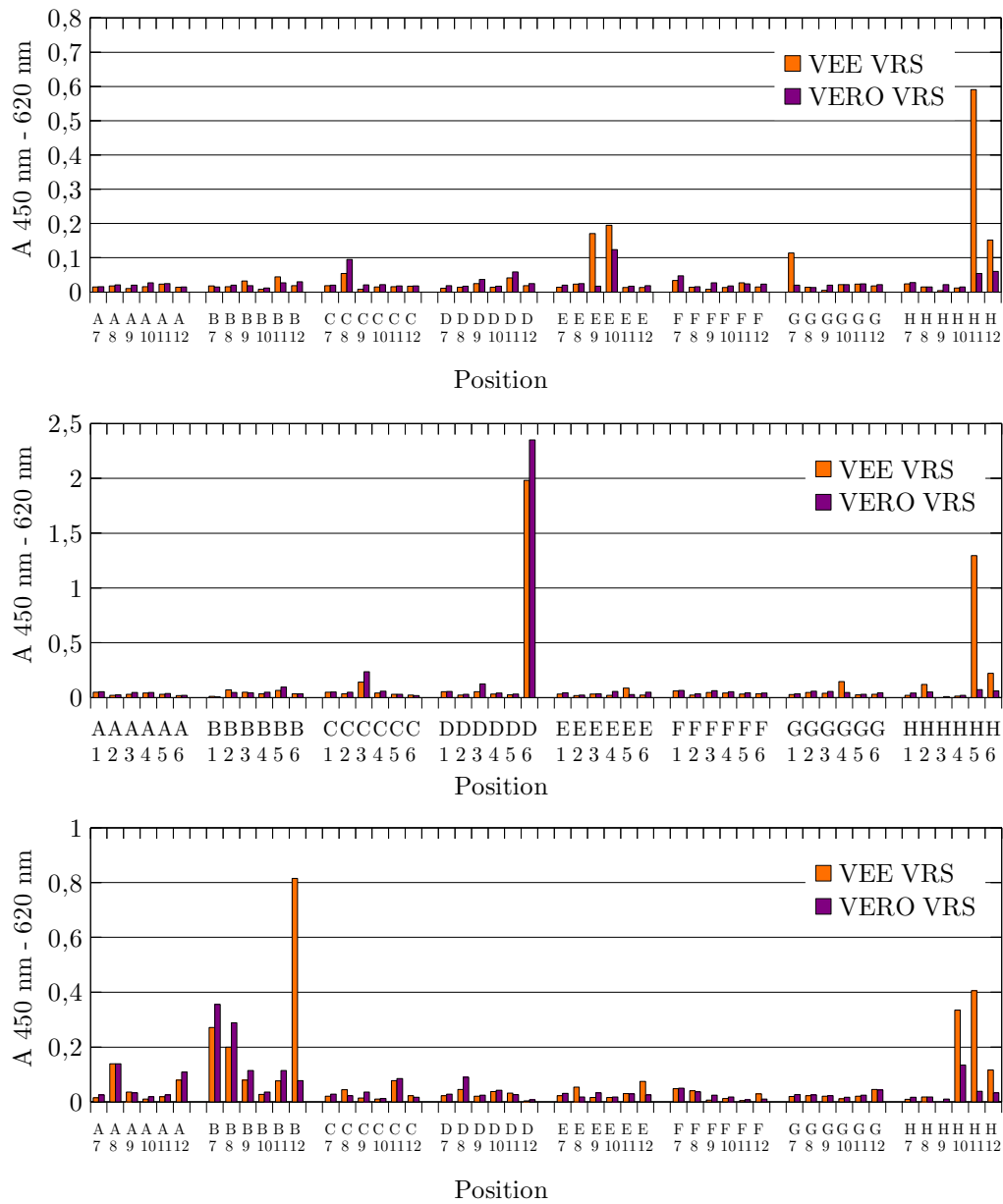


Abbildung A.3: Monoklonale ELISAs nach VEEV-Panning, Teil 2 –
Oben: VEEV-Panning, Runde 2, MTP 2, Spalten 7-12 der isolierten Klone,
Mitte: VEEV-Panning, Runde 2, MTP 3, Spalten 1-6 der isolierten Klone,
Unten: VEEV-Panning, Runde 2, MTP 3, Spalten 7-12 der isolierten Klone,
 Negativkontrolle H3/H9, Positivkontrolle H6/H12

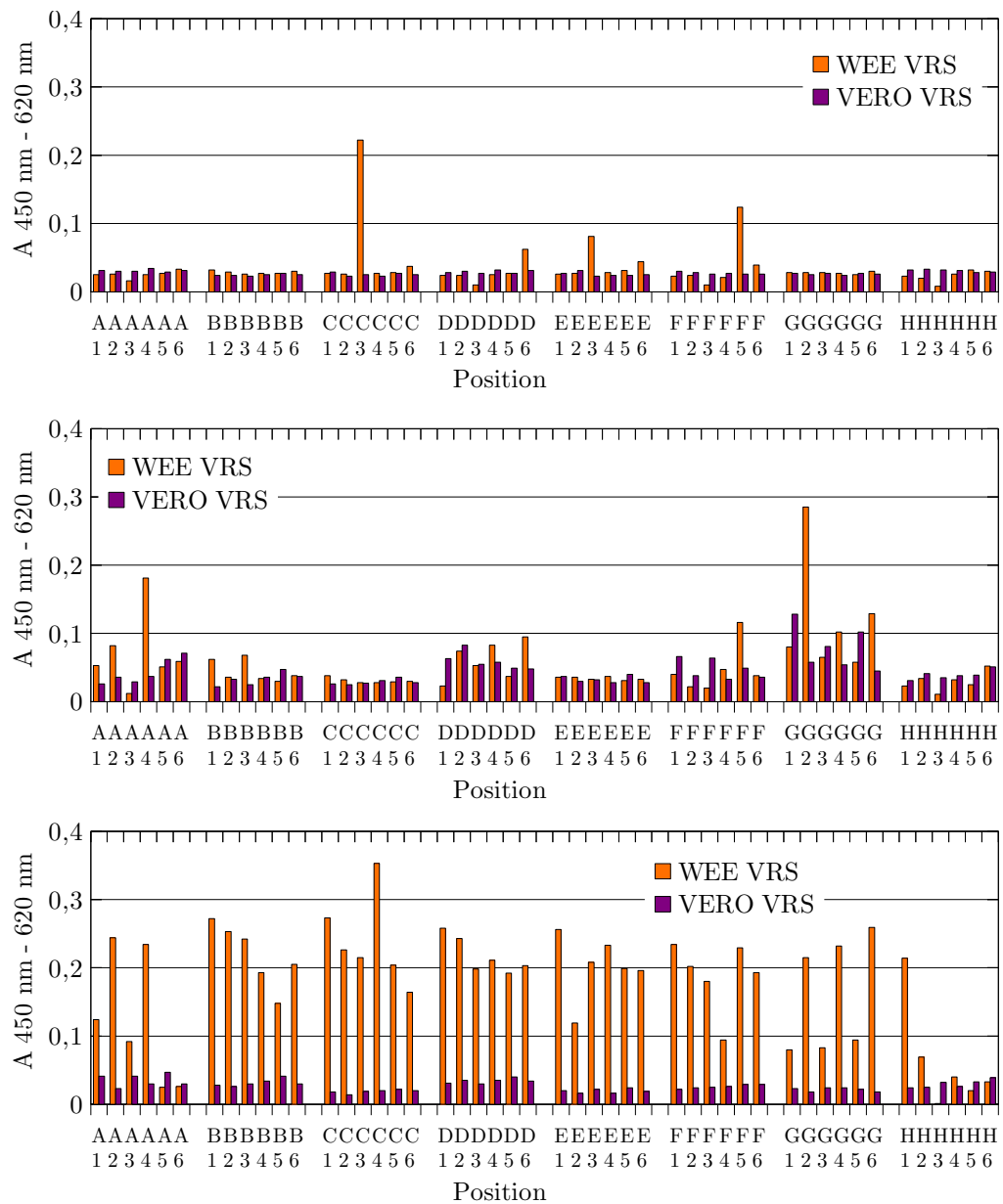


Abbildung A.4: Monoklonale ELISA nach WEEV-Panning –

Oben: WEEV- Panning, Runde 2, Spalten 1-6 der isolierten Klone,

Mitte: WEEV-Panning, Runde 3, Spalten 1-6 der isolierten Klone,

Unten: WEEV nach VEEV-Panning, Runde 3, Spalten 1-6 der isolierten Klone,

Negativkontrolle H3/H9, Positivkontrolle für diesen Test nicht verfügbar (kein produzierbarer scFv für das Antigen WEEV vorhanden)

A.3 Einzelexperimente zum VEEV-Sandwich-ELISA

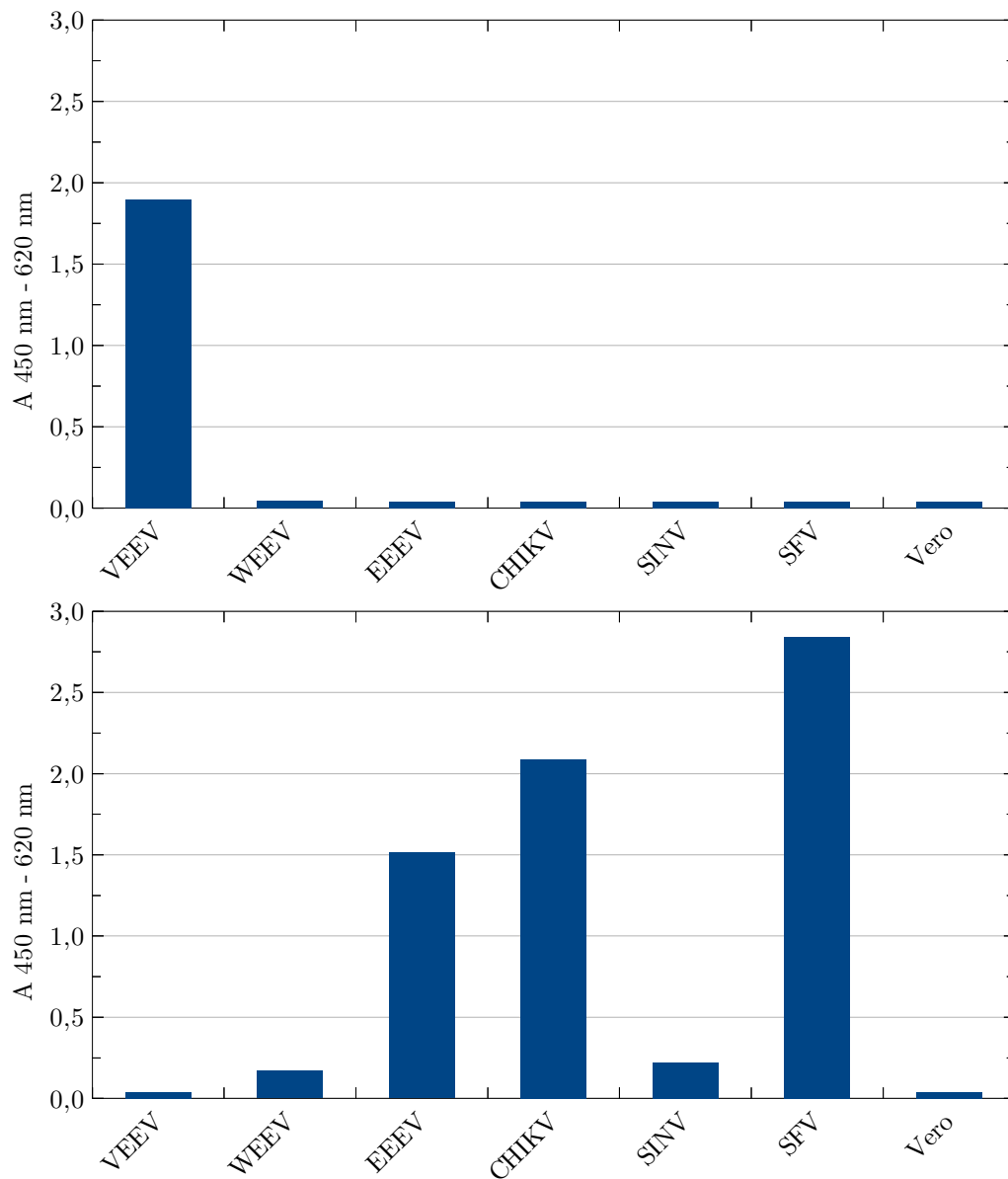


Abbildung A.5: Einzelexperimente zum VEEV-Sandwich-ELISA –
Oben: ELISA mit dem scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 als Fänger- und dem biotinylierten VEEV-spezifischen mAK VEE WIS1 als Nachweisantikörper,
Unten: ELISA mit dem scFv-Fc-Antikörper ToR67-3B4 als Fänger- und dem biotinylierten Alphavirus-spezifischen mAK SFV 12/2 als Nachweisantikörper